



**MANLAB®**

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

## Staphylococcus aureus METICILINO RESISTENTE (SAMR)

 16 min.



El Área de Microbiología de Laboratorios Manlab nos presenta una revisión sobre el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, uno de los patógenos responsables de las infecciones en el ámbito hospitalario. En este trabajo nos detallan su estructura y genoma, toxinas, colonización e infección, transmisión y patogenia y el mecanismo de resistencia a diferentes antimicrobianos.



Zintgraff Jonathan,  
Mainetti Paula,  
Hrehoraszcuk Maria Sol,  
Papantoniou Leonardo

Área Microbiología  
Manlab Diagnóstico Genómico y Bioquímico



E-mail: jonathan.zintgraff@manlab.com.ar



### Introducción

*Staphylococcus aureus* es un patógeno humano, de reconocida virulencia que causa infecciones nosocomiales y de la comunidad. En su variedad meticilino resistente, se presenta como uno de los patógenos más importantes. Al *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de origen comunitario SAMR-CA se lo distingue del *S.aureus* adquirido en centros de salud, al cual se lo denomina SAMR-HA. Hasta fines de la década del 90, en las infecciones de

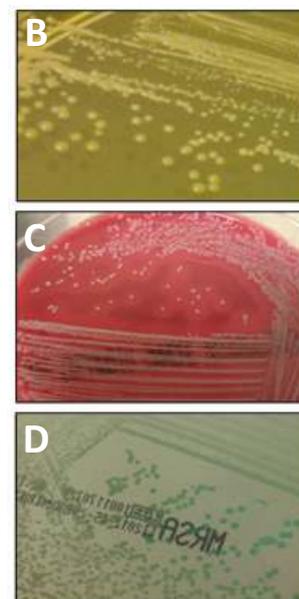
pacientes debidas a SAMR adquiridas en un nosocomio, se podía demostrar casi siempre que había existido internación previa, frecuente concurrencia al hospital, relación con personal de centros de salud o residencia en geriátricos, por lo que se consideraba que se trataba de SAMR-HA (1,2). Los aislamientos de SAMR-CA, por el contrario, se recuperaban en su mayoría de pacientes jóvenes, previamente sanos, que no habían tenido contacto previo alguno con centros de salud. Sin embargo esta tendencia ha ido cambiando, con decir que el SAMR-CA se aísla hoy en día, con mayor frecuencia, en instituciones de la salud.

### Componentes y estructura

*S. aureus* es un miembro de la familia *Micrococcaceae*. En el examen microscópico, el organismo aparece como cocos gram positivos de a pares o en racimos. Se distingue de otras especies de estafilococos por la pigmentación color "oro" de sus colonias y un resultado positivo en la prueba de la coagulasa, fermentación del manitol y el test de la DNAsa (Fig. 1).



Fig.1 A- Prueba de la DNAsa positiva. B- Prueba positiva de la fermentación del manitol, colonias amarillas características (MSA2 bioMérieux).C-Hemólisis en agar sangre Columbia (bioMérieux).D- Screening positivo para búsqueda de SAMR (MRSA bioMérieux)



### Genoma

El genoma del estafilococo está constituido por un cromosoma circular (de aproximadamente 2800 pb), con profagos, plásmidos y transposones. Los genes que regulan la virulencia y resistencia a los antibióticos se encuentran en el cromosoma, como así también en los elementos extracromosómicos (2).

### Pared celular

La pared celular (fig. 2) del estafilococo está constituida en su mayoría por peptidoglicanos (PG). Las cadenas glucosídicas del PG constan de dos aminoazúcares, N-acetil-glucosamina (NAcGlc) y ácido N-acetil-murámico (NAcMur), dispuestos en secuencia alternada y unidos por enlace  $\beta$ -1,4-glucosídico. Además, cada residuo de NAcMur lleva una cadena de 5 L- y D-

**Los bioquímicos de todo el país  
cuentan con nosotros**

**Somos Socios Complementarios**

Informes: (5411) 4508 2091 - [www.manlab.com.ar](http://www.manlab.com.ar)

**MANLAB<sup>®</sup>**  
Diagnóstico Bioquímico y Genómico

aminoácidos (pentapéptido). Dentro del peptidoglicano, aproximadamente el 95% de los péptidos están entrecruzados. El entrecruzamiento de los péptidos, de las cadenas laterales del pentapéptido, mediante puentes de pentaglicina (NH<sub>2</sub>-Gly5), ocurre entre el cuarto residuo de D-alanina y el grupo amino libre del tercer péptido de una cadena adyacente. Este entrecruzamiento organiza al peptidoglicano en una macromolécula única, protegiendo así al estafilococo de la lisis osmótica.

### Cápsula

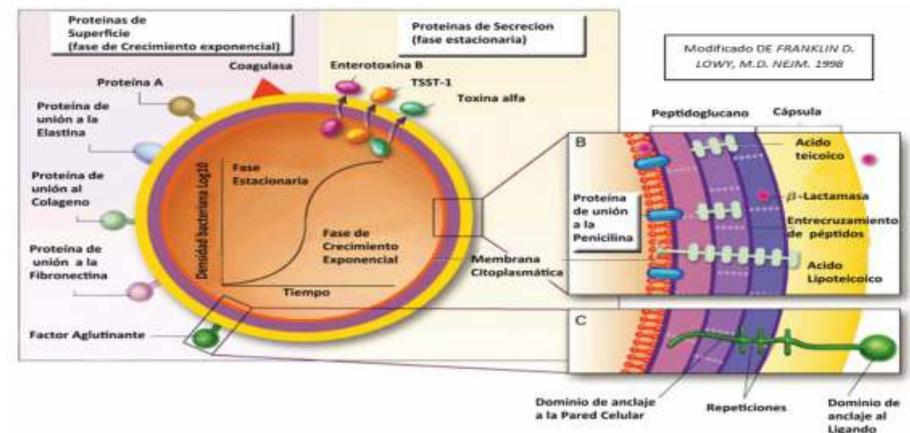
La mayoría de los estafilococos producen microcápsulas. De los 11 tipos de polisacáridos microcapsulares han sido identificados los serotipos 5 y 8 que constituyen el 75% de las infecciones humanas. La mayoría de los SAMR pertenecen al tipo 5. (4)

### Proteínas de superficie

Muchas proteínas de la superficie de estafilococos tienen ciertas características estructurales en común. Estas características incluyen: una secuencia señal secretora en la posición N-terminal. La proteína A (fig. 2), el prototipo de estas proteínas, tiene una propiedad antifagocítica que se basa en su capacidad para ligarse a la porción Fc de la inmunoglobulina. Varias de estas proteínas se han designado como MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix). Estudios recientes sugieren que estas proteínas desempeñan un papel importante en la capacidad de los estafilococos para colonizar tejidos. (5)



Fig.2. Componentes de la pared celular y proteínas de superficie de *S. aureus*



### Toxinas

*S. aureus* produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasas. La función principal de estas proteínas es degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina (6).

En el cuadro 1 se muestra una clasificación de los factores de virulencia de *S. aureus*, teniendo en cuenta si forman parte estructural de la bacteria o si son enzimas o toxinas.



Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglucano	Catalasa	Toxina $\alpha$ (Hemolisina $\alpha$ )
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina $\beta$
Ácidos teicoicos	Lipasa	Hemolisina $\gamma$
Polisacáridos capsulares	Coagulasa	Hemolisina $\delta$
	Nucleasas	Leucocidina Panton-Valentine (PVL)

Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas
Colagenasa	Toxina del Síndrome Shock Tóxico (TSST-1)
	Toxinas exfoliativas (ETA Y ETB)

Los factores de virulencia de *S. aureus* participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped. En base a esto los factores se han clasificado en tres categorías:

1) los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa (La importancia de la coagulasa en la patogenia de la enfermedad radica en que esta enzima causa la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localizando la infección y protegiendo a la bacteria de la fagocitosis);

2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Panton-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares;

3) los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina  $\alpha$ , hemolisinas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (6).

La leucocidina de Panton-Valentine (PVL) esta presente en un 60% a 100% en cepas SAMR-CA, la misma es citotóxica para los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del humano, es una proteína que forma poros en la membrana plasmática de los leucocitos, lo cual provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula. La lisis de los leucocitos produce la liberación de mediadores de la inflamación, con una consecuente respuesta inflamatoria grave (7). La toxina  $\alpha$  o hemolisina  $\alpha$ , es considerada como el prototipo de las citotoxinas formadoras de poros, es citolítica para un gran número de células, entre las que se encuentran los monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células endoteliales. La toxina  $\alpha$  es secretada por *S. aureus* y se

integra en la membrana de las células blanco, formando heptámeros cilíndricos que son capaces de lisar las células eucariotes. Los poros que produce permiten la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que eventualmente producen la muerte de las células nucleadas y la lisis osmótica de los eritrocitos. La formación de poros también produce eventos secundarios que promueven el desarrollo de secuelas patológicas. Estos eventos incluyen la activación de endonucleasas, excitosis de plaquetas y liberación de citocinas y mediadores inflamatorios. La producción de tromboxano y prostaciclina activa los mecanismos de vasoconstricción. Además, al romper la integridad celular aumenta la permeabilidad vascular. El efecto final en el hospedero es el edema pulmonar o síndrome de dificultad respiratoria.



Las personas colonizadas con cepas

### Colonización e infección

Los seres humanos son un reservorio natural de *S. aureus*. Entre un 30% y un 50 % de los adultos sanos están colonizados (11,12). Ambas cepas, meticilino-sensibles y resistentes, son persistentes colonizantes (13) Las personas colonizadas con *S. aureus* tienen un mayor riesgo de sufrir infecciones posteriores (14). Las tasas de colonización por estafilococos son altas entre los pacientes con diabetes tipo 1 (15), los usuarios de drogas intravenosas (16), los pacientes sometidos a cirugía, los pacientes en hemodiálisis (17,18,19), y pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (20).

### Transmisión

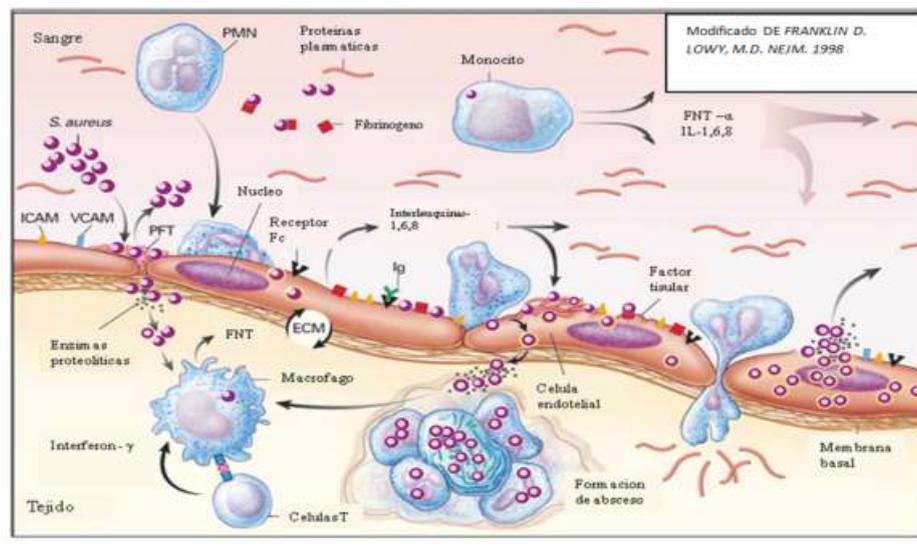
de *S. aureus* tienen un mayor riesgo de infectarse con estas cepas. La mayoría de los casos de infección nosocomial se adquieren mediante la exposición a las manos de los trabajadores de la salud después de haber sido colonizados por estafilococos transitoriamente de su propio depósito o del contacto con un paciente infectado.

### Patogenia de la Enfermedad

*Staphylococcus aureus* posee un diverso arsenal de productos y componentes que contribuyen a la patogénesis de la infección (21,22,23,24).

La virulencia de la infección por *S. aureus* es notable, dado que el organismo es un comensal que coloniza las fosas nasales, las axilas, la vagina, faringe o la superficie de la piel dañada. El reservorio principal de los estafilococos son las fosas nasales.

Fig.3: Patogenia de la enfermedad estafilocócica *S. aureus*



Como muestra la figura 3, la infección comienza cuando los estafilococos circulantes se unen a los sitios de daño vascular donde se formó la placa de trombos de fibrina. Las bacterias pueden conectar a través de mecanismos mediados por MSCRAMM. Alternativamente, pueden adherirse a las células endoteliales directamente a través de interacciones adhesina-receptor o por medio de ligandos que incluyen constituyentes del suero tales como fibrinógeno. Modificaciones del endotelio, que resultan de los cambios microambientales (tales como las alteraciones en la matriz extracelular [ECM]) puede indicar cambios en la susceptibilidad celular. Luego de la fagocitosis por las células endoteliales, las bacterias elaboran enzimas

**DIAGNOS MED S.R.L.**

Conesa 859 (C1426AQR) CABA  
Tel. 011 4552-2929 (Rot.) - Fax 011 4551-5296  
info@diagnosmed.com - www.diagnosmed.com



**EUROIMMUN**



- Neurología
- Endocrinología
- Gastroenterología
- Reumatología

www.euroimmun.com

**RSR**

Diagnostics for Autoimmunity  
www.rsrttd.com

- Acetylcholine Receptor Ab
- Steroid 21-Hydroxylase Ab
- Zinc Transporter 8 Ab
- Glutamic Acid Decarboxylase
- IA-2 Ab
- Aquaporin 4 Ab
- TSH Receptor Ab



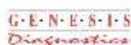
www.zentech.com

- Kits Screening Neonatal
- MSUD, Biotinidasa, G-6-PD, Fibrosis Quística

**AnshLabs.**

www.anshlabs.com

- Ultrasensitive AMH -Elisa-
- Inhibina B -Elisa-



www.elisa.co.uk



www.molecularmd.com



www.biovision.com



www.insitus.com



www.alpco.com



www.salimetrics.com



www.quidel.com



www.ebioscience.com



www.diasource-diagnostics.com



www.asuragen.com

proteolíticas que facilitan la propagación a los tejidos adyacentes y la liberación de los estafilococos en el torrente sanguíneo. El factor tisular es expresado por células endoteliales infectadas, facilitando la deposición de fibrina y la formación de abscesos. Una vez en los tejidos subepiteliales adyacentes, las bacterias provocan una respuesta inflamatoria que da lugar a la formación de abscesos. Esta secuencia de eventos contribuye al establecimiento de focos metastáticos de la infección, así como la patogénesis de la endocarditis.

Después de la fagocitosis, las células endoteliales expresan receptores Fc y moléculas de adhesión vascular [VCAM] y moléculas de adhesión intercelular [ICAM]) y la liberación de interleuquina-1, interleucina-6, y la interleucina-8. Como resultado, los leucocitos se adhieren a las células endoteliales, con diapédesis al sitio de infección. Los cambios en la conformación de las células endoteliales se traducen en un aumento de la permeabilidad vascular, con trasudación de proteínas plasmáticas. Los macrófagos y monocitos circulantes liberan interleucina-1, interleucina-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) después de la exposición a los estafilococos. La activación del macrófago se produce después de la liberación de interferón- $\gamma$  por las células T. Las citocinas liberadas en el torrente sanguíneo de los monocitos o macrófagos, así como las células endoteliales, contribuyen a las manifestaciones del síndrome de sepsis y la vasculitis asociada con la enfermedad estafilocócica sistémica. La expresión de receptores Fc puede contribuir a la vasculitis, ocasionalmente encontrada durante la bacteriemia, actuando como un sitio de unión para la inmunoglobulina (Ig) o complejos inmunes.

### **Mecanismos de Resistencia a los Agentes Antimicrobianos**

En la actualidad la mayoría (se dice la mayoría y no exactamente el porcentaje, el cual posiblemente esté por encima del 90%, porque no se conoce con exactitud) de los estafilococos son productores de beta-lactamasas, de modo que inactivan enzimáticamente a la penicilina. La sensibilidad a

penicilina implica sensibilidad a todos los beta-lactámicos, para esto deberíamos estar seguros que no hay producción de beta-lactamasas. La detección de la producción de beta-lactamasas implica que la cepa sea resistente a todas las penicilinas sensibles a penicilinasas (ampicilina, amoxicilina, piperacilina). Los métodos de sensibilidad habituales (difusión y/o dilución) no permiten discernir exactamente entre cepas productoras o no de beta-lactamasas. Por ello, para poder decir que una cepa tiene o no beta-lactamasas se debería realizar un método de detección de la enzima, siendo el método de nitrocefín el más utilizado. Hoy en día prácticamente no se realiza este test sobre estafilococos; por un lado, por la altísima prevalencia de beta-lactamasas en estas bacterias y por el otro, porque se dispone de otras alternativas terapéuticas. Los inhibidores de beta-lactamasas como sulbactam y ácido clavulánico son activos frente a esta enzima.

### **Resistencia a meticilina**

La resistencia a meticilina/oxacilina se puede deber a dos causas. Una de ellas, la más frecuente, es por adquisición del gen *mecA* que codifica para la síntesis de una PBP extra, denominada PBP2a. Esto implica resistencia a todos los beta-lactámicos, incluso las combinaciones con inhibidores de beta-lactamasas y también carbapenemes (habría que hacer una consideración en este punto referido a nuevas cefalosporinas como el Ceftaroline, aún no disponible en el mercado, que han demostrado tener actividad frente a SAMR). El otro mecanismo de resistencia a meticilina/oxacilina es la hiperproducción de beta-lactamasas (la misma que presentamos antes) o por la presencia de PBPs. modificadas, sin implicancia del gen *mecA*. A esta última se la denomina MODSA (Modified-PBPs *S aureus*). Este mecanismo es poco frecuente y menos relevante que la verdadera meticilino-resistencia mediada por PBP2a.

El gen *mecA* determinante de la resistencia a meticilina, codifica para la producción de una PBP extra, la PBP2a. Decimos "extra", porque se suma a las PBPs

naturales de estafilococos. El gen *mecA*, sus reguladores *mecI* y *mecR1*, y otros elementos (por ejemplo transposones [Tn554]) que suelen incluir determinantes de resistencia a otros antibióticos, se encuentran dentro de un elemento genético móvil denominado cassette. Este cassette posee el complejo del gen *mecA*, el complejo del gen *ccr* de recombinasas y el resto de las regiones se denominan "junkyard regions".

Las regiones del complejo *mec* y *ccr* tiene diferencias alotípicas que definen los diferentes tipos y subtipos de cassettes SCC*mec*. Las regiones "junkyard", o simplemente J, también presentan variantes, lo que definirá los subtipos. En estas regiones J pueden o no existir otros determinantes genéticos de resistencia (en transposones por ejemplo). Meticilino-Resistencia "del hospital" y "de la comunidad"

La meticilino resistencia inicialmente surgió en el ámbito hospitalario o en pacientes con diferentes co-morbilidades. Las cepas de *S. aureus* meticilino-resistentes del hospital (SAMR-HA,) fueron ampliamente estudiadas, describiéndose diversas características propias. Entre ellas resaltamos la presencia de la PBP2a, codificada por el gen *mecA*, responsable de la meticilino-resistencia en sí, que como vimos otorga resistencia a TODOS los beta-lactámicos (al menos hasta ahora). Una característica llamativa de este mecanismo de resistencia es que su expresión puede ser homogénea (> 99% de las células la manifiestan) o heterogénea de diversos grados (frecuencias de expresión de la resistencia entre las células bacterianas de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-8</sup>). Esta propiedad hace que se presenten dificultades para detectar la meticilino-resistencia, en especial en las cepas heterogéneas de alto grado (baja frecuencia de expresión). Por ello se han propuesto una gran cantidad de métodos para mejorar su detección, incluyendo métodos moleculares. Los cassettes involucrados en SAMR-HA suelen ser los tipos I, II o III, que habitualmente conllevan diversos determinantes de resistencia, lo que comúnmente se ha denominado "resistencia acompañante". Posteriormente, hace relativamente pocos años, surgieron



Ayudando a las  
personas a vivir  
saludablemente

## BD Vacutainer<sup>®</sup>

Solución integral al  
alcance de su laboratorio.



## BD Diagnostic Systems

Calidad, confiabilidad y servicio en  
las soluciones de la microbiología.



## BD Biosciences

Excelencia en herramientas  
para investigación y diagnóstico.



Contáctenos al:

e-mail: [crc\\_argentina@bd.com](mailto:crc_argentina@bd.com) - tel: 0800 444 55BD (23) - [www.bd.com](http://www.bd.com)

cepas SAMR con características claramente diferentes de las expresadas previamente. En primer lugar, éstas ocurrían en personas sin co-morbilidades ni exposición a ámbitos de cuidados de salud, y por ello se denominaron “adquiridas en la comunidad” (SAMR-CA, community acquired SAMR). A semejanza de las SAMR-HA, la resistencia está mediada por la PBP2a, codificada por el gen *mecA*, otorgando resistencia a TODOS los antibióticos beta-lactámicos. Sin embargo, en las SAMR-CA los cassettes SSCmec involucrados son distintos (IV, V, VI, etc.), siendo más pequeños, por ende más fácilmente movilizables (transmisibles), sin genes de resistencia acompañante, y de expresión heterogénea, pudiendo entonces presentarse problemas para su detección. Una característica sobresaliente de la SAMR-CA que pronto fue notada es que no solamente son capaces de afectar a personas previamente sanas, sino que pueden producir infecciones muy severas, incluso mortales. Esto se debe a una diversidad de factores de virulencia que conllevan, de los cuales el más conocido es la leucocidina PVL (Panton-Valentine Leucocidine). Una acotación, si bien existen diferencias genotípicas y fenotípicas entre SAMR-HA y SAMR-CA que se utilizan para distinguirlas, la definición de ambas clases es más bien epidemiológica. Además, se producen movimientos tanto de cepas de SAMR-HA hacia la comunidad como la inversa, cepas



Cepas MRSA hospitalarias (SAMR-HA)	Cepas MRSA adquiridas de la comunidad (SAMR-CA)
Resistencia a múltiples ATB	Resistencia por lo general a solo betalactámicos
SCCmec tipo I,II,III	SCCmec tipo IV,V
Presentan gran cantidad de toxinas	Leucocidina de Panton-Valentine
Producen gran cantidad de procesos infecciosos	Principalmente infecciones de piel y partes blandas, septicemia
Cepas aisladas en pacientes con factores de riesgo nosocomiales	Cepas aisladas en la comunidad en pacientes que carecen de factores de riesgo de una infección nosocomial
Cinco clones pandémicos	Dos clones pandémicos: USA300 y USA400

SAMR-CA que se introducen en el ámbito hospitalario, complicando aún más su distinción.(25)

#### Resistencia a la vancomicina.

Los glicopéptidos han sido el pilar del tratamiento de las infecciones por SAMR desde la introducción de estos antibióticos en 1958; sin embargo, el aislamiento de enterococos resistentes (VRE, vancomycin-resistant Enterococci) y de estafilococos coagulasa-negativos con susceptibilidad disminuida a finales de la década de 1980 (26), hicieron temer la aparición de resistencia en *S. aureus*. Casi una década después, en 1997, se informó en Japón la primera cepa con una concentración inhibitoria mínima (CIM) para vancomicina de 8 µg/ml (27) y el primer aislamiento con una CIM >32 µg/ml se registró en Estados Unidos a mediados de 2002 (28).

#### Definiciones: VISA, hVISA, VRSA

La literatura sobre la resistencia a vancomicina en *S. aureus* se presta a confusión por las diferencias en los puntos de corte usados en varios países. El CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, antes NCCLS) de los Estados Unidos (29) y la SFM (Société Française de Microbiologie) (30) utilizan 3 categorías: sensible (CIM ≤ 2 µg/ml), intermedio (CIM entre 4 y 8 µg/ml) y resistente (CIM ≥ 16 µg/ml); mientras que la BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) y el SRGA (Swedish Reference Group for Antibiotics) sólo 2 categorías: sensible (CIM ≤ 4 µg/ml) y resistente (CIM ≥ 8 µg/ml) (31,32). Esto ha llevado al uso impreciso de los acrónimos VISA (vancomycin-intermediate *S. aureus*) y VRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*). Debido a que las cepas VISA y VRSA aisladas son resistentes también a teicoplanina se han propuesto los términos GISA y GRSA (por glycopeptide-intermediate y glycopeptide-resistant *S. aureus*) como más adecuados; sin embargo, las diferencias entre países en los puntos de corte para este antibiótico, y el aislamiento de cepas resistentes a teicoplanina sensibles a vancomicina, no hacen recomendable el uso de esta terminología. Existe otra categoría

correspondiente a cepas de *S. aureus* con CIM ≤ 2 µg/ml (sensibles) en las pruebas estándar, pero que presentan subpoblaciones con CIM 4-8 µg/ml al realizar un perfil de análisis poblacional (PAP, del inglés population analysis profile). Estas cepas se han denominado hetero-VISA (hVISA).

#### Resistencia intermedia a vancomicina: cepas VISA

Los casos informados de infecciones por VISA no permiten establecer factores de riesgo específicos; sin embargo, se encuentran algunos puntos comunes: los pacientes presentaban enfermedades de base similares (cáncer, diabetes mellitus e insuficiencia renal), la mayoría habían sido sometidos a diálisis y tenían bacteriemias asociadas con catéteres o material protésico, y habían sido expuestos a dosis plenas de vancomicina por períodos muy prolongados (entre 6 y 18 semanas) 3 a 6 meses antes de la detección de la infección por VISA (44). Además, los reportes de los Estados Unidos sugieren que las cepas VISA se desarrollaron a partir de cepas de MRSA que infectaron previamente los pacientes, dada la identidad entre sus patrones de electroforesis de campo pulsado (PFGE, pulsed-field gel electrophoresis) (45,46).

Existen 2 tipos de blanco para la vancomicina: en primer lugar, los residuos libres de D-Ala-D-Ala en las capas terminadas de peptidoglicano y, en segundo, los monómeros de peptidoglicano que emergen de la membrana plasmática, los cuales son el sustrato de las transglicosilasas (47).

El mecanismo de resistencia a vancomicina ha sido estudiado extensamente en la primera cepa VISA, Mu50 (48,49). Las pruebas bioquímicas y la microscopía electrónica indican que esta cepa produce mayores cantidades de peptidoglicano (debido a la mayor incorporación de GlcNAc, la mayor concentración de monómeros de peptidoglicano y la mayor producción de PBP2 y 2A), y que su pared celular es más gruesa (entre 30 y 40 capas de peptidoglicano). Como consecuencia, un mayor número de moléculas de vancomicina pueden ser atrapadas antes de llegar a la

membrana citoplasmática, donde actúan las transglucosilasas. Este mecanismo se ha denominado "atrapamiento de afinidad". Adicionalmente, se ha visto que la estructura externa de la pared celular se distorsiona por las moléculas secuestradas de vancomicina, lo que impide aun más la entrada de otras moléculas del antibiótico (50). Además del engrosamiento de la pared, se ha observado una disminución en el grado de entrecruzamiento (cross-linking) de las cadenas de peptidoglicano, lo cual aumenta el número de D-Ala-D-Ala libres en las capas externas de la pared y por tanto más antibiótico puede ser atrapado antes de llegar al sitio de acción (51). Se han planteado 2 hipótesis para explicar este fenómeno: la disminución de la amidación de los muropéptidos y la reducción en la expresión de la PBP4.

#### Resistencia intermedia heterogénea a vancomicina: cepas hVISA

El fenómeno de la heterorresistencia, o sea, la distribución no

homogénea del fenotipo resistente en una población bacteriana, se conoce en *S. aureus* desde el desarrollo de la resistencia a metilina (52). A comienzos de los años 1980 se observó que si bien todas las células de MRSA en una población dada poseían el gen *mecA*, la CIM de metilina variaba desde unos pocos microgramos por mililitro por encima del punto de corte de susceptibilidad hasta niveles cientos de veces más altos, hecho que se atribuye a la expresión diferencial de otros determinantes genéticos involucrados en la resistencia, tales como el gen *femA* (53). Se postula que el uso de carbapenemes y subpoblaciones de células con resistencia intermedia (CIM entre 4 y 8 µg/ml), mientras la CIM global está en el rango de susceptibilidad (< 2 µg/ml). La vancomicina crea una presión selectiva que favorece el predominio de las subpoblaciones de células más resistentes, generando hVISA y, eventualmente, con la exposición continua, una población uniforme de VISA (54). Actualmente no hay un método estan-

darizado para identificar las cepas hVISA. El análisis poblacional se ha propuesto como la técnica más precisa. La significancia clínica de hVISA no se ha definido con exactitud, en particular debido a que algunos consideran que la vancomicina tiene menor efecto bactericida contra *S. aureus* que los β-lactámicos y que su penetración al sitio de la infección es limitada por el gran tamaño de la molécula, características que podrían por sí solas explicar las fallas terapéuticas observadas en infecciones por estas cepas (56,57). Desde un punto de vista biológico, el status hVISA conferiría una ventaja de supervivencia a *S. aureus*, ya que si bien dosis terapéuticas de vancomicina eliminan 99,9% de la población, la fracción restante sobrevive y es capaz de crecer a concentraciones de antibiótico de 4 µg/ml o superiores. Estas células VISA gastan gran cantidad de energía para engrosar la pared celular y tienen una adaptabilidad evolutiva (fitness) menor que las cepas VSSA, por lo cual tienden a revertir al fenotipo hVISA una vez cesa la presión del antibiótico. Sin



## Quimioluminiscencia

Access<sup>2</sup>  
IMMEDIATE RESULT



### Reproductive

AFP (ONTD)  
DHEA-S  
Estradiol  
hFSH  
hLH  
Inhibin A  
PIGF  
(preeclampsia)\*  
sVEGF R1  
(preeclampsia)\*  
Progesterone  
Prolactin  
Testosterone  
Total βhCG  
Unconjugated Estriol  
SHGB (sex hormone binding globulin)



### Thyroid

Free T3  
Free T4  
HYPERsensitive hTSH  
(3rd generation)  
Thyroglobulin  
Thyroglobulin Ab  
Total T3  
Total T4  
TPO Ab



### Anemia

Vitamin B12  
Erythropoietin  
Ferritin  
Folate  
Intrinsic Factor Ab  
RBC Folate  
Soluble Transferrin Receptor



### Tumor Markers

AFP  
BPH-A\*  
CEA  
CA 15-3 Antigen  
CA 19-9 Antigen  
CA 125 Antigen  
Hybritech® PSA  
Hybritech® free PSA  
[-2]proPSA\*



### Skeletal

**Bone Metabolism**  
Intact PTH (Routine / Intra-Operative)  
Ostase® Bone Alkaline Phosphatase  
Ultrasensitive hGH  
Vitamin D\*



### Infectious Disease

Toxo IgM  
Toxo IgG  
Rubella IgM  
Rubella IgG  
CMV IgM\*  
CMV IgG\*  
**Blood Virus**  
HAV IgM  
HAV Ab  
HBs Ag  
HBs Ag  
HBs Ag  
Confirmatory  
HBs Ab  
HBc IgM  
HBc Ab  
HCV Ab  
HIV 1/2 Ab\*



### Specialty

**Diabetes**  
Ultrasensitive Insulin  
**Allergy**  
Total IgE

**Inflammation**  
Interleukin-6



### Cardiac

AccuTni® Troponin I  
β2-Glycoprotein 1 Ab\*  
CK-MB  
Myoglobin



### Adrenal/ Pituitary

Cortisol  
(Serum and Urine)

\* Consultar disponibilidad

**BIODIAGNOSTICO**

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires - Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

embargo, cuando se exponen nuevamente a vancomicina generan mutantes resistentes con una alta frecuencia, lo que asegura la supervivencia de la cepa (58). Infecciones producidas por cepas hVISA están asociadas con altas tasas de fracaso terapéutico, Estas cepas se comportan como tolerantes a la vancomicina. Varios agentes nuevos antiestafilocócicos están disponibles para la terapia parenteral, incluyendo la daptomicina, linezolid, tigeciclina, y quinupristina-dalfopristina (no comercializada en nuestro país). La daptomicina, que es bactericida y puede ser administrada una vez al día a pacientes con función renal normal, ha demostrado ser eficaz contra infecciones de piel y partes blandas ocasionadas por SAMR y se ha utilizado en episodios de bacteriemia en adultos. En un estudio aleatorizado, controlado con los adultos, daptomicina no fue inferior a la vancomicina para el tratamiento de endocarditis derecha por *S. aureus*, aunque los fracasos del tratamiento se debieron a la aparición de resistencia a la daptomicina durante la terapia. La daptomicina no es útil para la neumonía porque se inactiva por surfactante pulmonar. Se carece de datos para ser utilizada en pacientes pediátricos.

La tigeciclina, está relacionada químicamente con la minociclina, y ha sido aprobada para su uso en pacientes con infecciones intra-abdominales, piel y partes blandas con una tasa de curación similar a la de la vancomicina. Este agente bacteriostático se administra dos veces al día por vía intravenosa. La tigeciclina no es apropiada para los niños menores de 8 años de edad.

Linezolid es muy adecuado para tratar infecciones respiratorias ocasionadas por SAMR debido a su excelente penetración en el pulmón, y puede ser una elección apropiada especialmente en los casos en los que el valor de CIM de vancomicina es alto.

#### Resistencia total a vancomicina: cepas VRSA

En 1992, Noble et al. (59) reportaron la transferencia in vitro y sobre la piel de un ratón de los genes de resistencia a

vancomicina de una cepa de *Enterococcus faecalis* a *S. aureus*, confiriéndole resistencia total (CIM > 16 µg/ml). Desde entonces se ha postulado que puede ocurrir transferencia de material genético si los dos microorganismos comparten el mismo nicho ecológico. Al respecto, estudios de Ray et al. (60) demostraron que hasta 62% de los pacientes colonizados con VRE tienen también *S. aureus* en el tracto gastrointestinal, constituyendo un reservorio potencial para la aparición de cepas resistentes. La característica de la mayoría de los aislamientos es la presencia del fenotipo Van A, que confiere resistencia a vancomicina mediante la sustitución del extremo D-Ala-D-Ala del monómero de peptidoglicano por D-Ala-D-Lactato, cuya afinidad por el antibiótico es 1.000 veces menor que la del monómero silvestre.

#### Antibióticos beta lactámicos contra SAMR

La FDA aprobó para ser comercializada en USA la ceftarolina fosamil. La misma es la prodroga de la ceftarolina (CPT), el primer beta lactámico con actividad anti *S. aureus* meticilino resistente, indicada para el tratamiento de la neumonía bacteriana adquirida de la comunidad y para infecciones agudas de piel y tejidos blandos. CPT inhibe la síntesis de la pared celular uniéndose irreversiblemente a las PBP 1 a 3, incluyendo la PBP2a que confiere meticilino resistencia. CPT mantiene actividad contra cepas de SAMR con susceptibilidad reducida a vancomicina y daptomicina incluyendo hetero-VISA, VISA, VRSA y cepas no susceptibles a daptomicina. Es dos veces más potente in vitro contra *S. aureus* que el ceftobiprole, el otro agente beta lactámico con actividad anti MRSA evaluado en fase III. En USA sólo el 5,2% de cepas presentan CIM > 1 (el punto de corte de susceptibilidad sugerido por FDA es ≤ 1 µg/ml) mientras que en Europa alcanza al 17.3% (61,62).

#### Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a Dr. Manuel Boutoureira, Dra. Raquel Osatinsky y Dr. Rolando Soloaga por el apoyo constante y aplacar nuestras "inquietudes" permanentes.

#### Bibliografía

1. Wilkinson BJ, Biology. In: Crossley KB, Archer GL, eds. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingstone, 1997:1-38.
2. Novick RP. The staphylococcus as a molecular genetic system. In: No-vick RP, ed. Molecular biology of the staphylococci. New York: VCH, 1990: 1-37.
3. Curso a distancia sobre Bacteriología Clínica Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Buenos Aires y Universidad Kennedy, 2010
4. Lee JC. The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 1996; 4: 162-6.
5. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Ann Rev Microbiol 1994; 48: 585-617.
6. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 16-34.
7. Saïd-Salim B, Mathema B, Braughton K, Davis S, Sinsimer D, Eisner W, Likhoshvay Y, Deleo FR, Kreiswirth BN. Differential distribution and expression of Panton-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 2005; 43: 3373-9.
8. Schmitt CK, Meysick KC, O'Brien AD. Bacterial toxins: friends or foes? Emerg Infect Dis 1999; 5:224-34.
9. Moore PCL, Lindsay JA. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. J Clin Microbiol 2001; 39: 2760-7.
10. Bronner S, Monteil H, Prévost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. FEMS Microbiol Rev 2004; 28: 183-200.
11. Noble WC, Valkenburg HA, Wolters CHL. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. J Hyg (Lond) 1967; 65: 567-73.
12. Casewell MW, Hill RLR. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1986; 18: Suppl A: 1-12.
13. Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 1994; 19: 1123-8.
14. Wenzel RP, Perl TM. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. J Hosp Infect 1995; 31: 13-24.
15. Tuazon CU, Perez A, Kishaba T, Sheagren JN. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients: an increased carrier rate. JAMA 1975; 231: 1272.
16. Tuazon CU, Sheagren JN. Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. J Infect Dis 1974; 129: 725-7.
17. Yu VL, Goetz A, Wagener M, Smith PB, Rihs JD, Hanchett J, Zuravleff JJ. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis: efficacy of antibiotic prophylaxis. N Engl J Med 1986; 315: 91-6.
18. Weinstein HJ. The relation between the nasal-staphylococcal-carrier state and the incidence of postoperative complications. N Engl J Med 1959; 260: 1303-8.
19. Kluytmans JAJW, Mouton JW, Ijzerman EPF, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. J Infect

Dis 1995; 171: 216-9.

20. Weinke T, Schiller R, Fehrenbach FJ, Pohle HD. Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 985-9.

21. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990; 248: 705-11. [Erratum, *Science* 1990; 248: 1066.]

22. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 4th ed. Vol. 2. New York: Churchill Livingstone, 1995: 1754-77.

23. Foster TJ, Hartford O, O'Donnell D. Host-pathogen protein-protein interactions in *Staphylococcus*. In: McCrae MA, Saunders JR, Smyth CJ, Stow ND, eds. *Molecular aspects of host-pathogen interaction*. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1997: 67-94.

24. Crossley KB, Archer GL, eds. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone, 1997.

25. Curso a Distancia RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Buenos Aires. Universidad Kennedy.

26. Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med* 1987; 316: 927-31.

27. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 135-6.

28. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51: 565-7.

29. Clinical Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* 2012.

30. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Communiqué. *Pathol Biol* 1998; 46: 1-16.

31. British Society of Antimicrobial Chemotherapy. Revised guidelines for the control of MRSA infections in hospitals. *J Hosp Infect* 1998; 39: 253-90.

32. Olsson-Liljequist B, Larsson P, Walder M, Miorner H.

Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. *Scand J Infect Dis* 1997; 105: 13-23.

33. Liñares J. The VISA/GISA problem: therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 8-15.

34. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. *N Engl J Med*. 1999 Feb 18; 340 (7): 493-501.

35. Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, Maupin PS, Tenover FC, Hill BC et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. *Emerging Infect Dis* 1999; 5: 147-9.

36. Watanakunakorn C. Mode of action and in vitro activity of vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 1984; 14: 7-18.

37. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 199-209.

38. Hanaki H, Labischinski, Inaba Y, Kondo N, Murakami H, Hiramatsu K. Increase in glutamine non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *S. aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 315-20.

39. Cui L, Murakami H, Kuwahara-Aria K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a thickened cell wall and anid glutamine non-amidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2276-85.

40. Hiramatsu K. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resist Updat* 1998; 1: 135-50.

41. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci. Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microb Rev* 1997; 10: 781-91.

42. Murakami K, Tomasz A. Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1989; 171: 874-9.

43. Liu C, Chambers H. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3040-5.

44. Tanaka T, Okuzumi K, Iwamoto A, Hiramatsu K. Retrospective study on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains in Tokyo University Hospital. *J Infect Chemother* 1995; 1: 40-9.

45. Ariza J, Pujol M, Cabo J, Pena C, Fernández N, Linares J et al. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet* 1999; 353: 1587-8.

46. Schwaber MJ, Wright SB, Carmeli Y, Venkataraman, DeGirolami PC, Gramatikova A et al. Clinical implications of varying degrees of vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerging Infect Dis* 2003; 9: 657-64.

47. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 147-55.

48. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 72: 195-8.

49. Ray AJ, Pultz NJ, Bhalla A, Aron DC, Donskey CJ. Coexistence of vancomycin-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* in the intestinal tracts of hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 875-8.

50. Noel AR, Tomaselli S, Bowker KE. Pharmacodynamics of Ceftaroline against *Staphylococcus aureus* Studied in an In Vitro Pharmacokinetic Model of Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Jun; 57(6): 2451-6.

51. Brian J. Werth, Molly E. Steed, Glenn W. Kaatz, Michael J. Rybak. Evaluation of Ceftaroline Activity against Heteroresistant Vancomycin-Intermediate Methicillin-Resistant *S. aureus* Strains in an In Vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model: Exploring the "Seesaw Effect"



## RealTimePCR Kits y Rotorgene

Standard en Diagnósticos de Patógenos

Equipo PCR Tiempo Real

tecnolab  
S.a.

### artus® kits



Consulte  
por kits  
disponibles!

#### Conveniencia

- Misma estructura en todos los kits
- Misma forma de trabajo
- Mínimos pasos de pipeteo

#### Estandarización

- Cuentan con aprobación CE IVD
- Validados junto a kits de purificación
- Resultados cuantitativos de carga viral

#### Flexibilidad

- Escalables
- MultidetECCIÓN
- Diseño de primers y sondas que aseguran la más alta sensibilidad y especificidad
- Controles internos (IC)
- Apto para automatización

### rotor-gene® Q



#### Características

- Formato Rotatorio, diseño centrífugo
- Calentamiento por convección de aire
- Excelente uniformidad térmica
- Mayor precisión y sensibilidad
- Disponible en opción de 5 ó 6 canales, así como 5 canales más canal HRM
- Alta performance en la detección de Patógenos con los Kits Artus
- Permite validación óptica y térmica por parte de usuario (Opcional)
- Fácil de usar, no requiere calibración
- Mínimo mantenimiento, pocas partes móviles