



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Resistencia a daptomicina en el género
Staphylococcus. Análisis lipídico y genético

Dña. Laura Martínez Jiménez
2020

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no se habría podido realizar sin el apoyo y la ayuda de mis directores, la doctora Genoveva Yagüe Guirao y el doctor Pedro Luis Valero Guillén. Muchas gracias por enseñarme tanto y ayudarme a crecer como científica y como persona. También quiero agradecer a la doctora Carme Salvador todo su apoyo y cariño. Muchas gracias por enseñarme y guiarme en mi primer contacto con el mundo de la investigación.

Debo agradecer también la ayuda proporcionada por el Servicio de Instrumentación Científica de la ACTI (Universidad de Murcia), en especial a Pepe, Isabel y Alejandro por su paciencia y su gran trabajo.

También quiero elogiar al servicio de Microscopía y al servicio de Análisis de Imagen de la ACTI (Universidad de Murcia), por su gran ayuda.

Gracias a la unidad de secuenciación y bioinformática del FISABIO (Valencia) y a la plataforma de genómica del IMIB, en especial a la doctora Anabel Antón por su gran apoyo y guía, gracias a los cuales he podido aprender muchísimo.

Debo agradecer también a Laura Martínez Arenas y María Alarcón Ferrer su participación en mi formación como investigadora. Gracias a vosotras he podido experimentar lo que es enseñar y transmitir la pasión por la investigación, y me alegro mucho de haber podido contribuir en una pequeña parte de vuestra carrera.

Quiero dar las gracias a mis compañeras de laboratorio Ana y Clara, y a Loli por estar siempre conmigo en los buenos y en los malos momentos para sacar siempre lo mejor de mí. Habéis conseguido que estos cuatro años de largos días en el laboratorio hayan pasado muy rápido.

Mi mayor apoyo estos años han sido, sin duda, mis padres, Joaquín y Charo, mi hermana María y por supuesto, mi compañero de vida, Antonio. Lo sois todo para mí. Nunca podría haber realizado esta tesis sin vuestro apoyo, vuestros consejos y vuestro infinito cariño. Solo puedo deciros, muchas gracias por estar ahí siempre y quererme tanto. Mi vida es maravillosa gracias a que os tengo a vosotros.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
GUIA DE FIGURAS Y TABLAS	12
Figuras.....	13
Tablas	17
RESUMEN.....	19
Resumen	20
Abstract.....	22
INTRODUCCIÓN	24
1. Género <i>Staphylococcus</i>	25
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3. <i>Staphylococcus capitis</i>	30
4. Envoltura celular en el género <i>Staphylococcus</i>	31
4.1 Peptidoglicano.....	31
4.2 Ácidos teicoicos y lipoteicoicos.....	34
4.3 Proteínas de pared	36
5. Evolución de la resistencia a antibióticos en el género <i>Staphylococcus spp.</i>	44
5.1 Resistencia a β -lactámicos	45
5.2 Resistencia a glucopéptidos	47
5.3 Resistencia a lipoglucopeptidos	50
5.4 Resistencia a linezolid	51
6. Daptomicina.....	52
6.1 Mecanismo de acción.....	53
6.2 Mecanismos de resistencia a daptomicina	55

6.3 Relación entre vancomicina y la resistencia a daptomicina	62
OBJETIVOS	63
MATERIALES Y MÉTODOS	66
1. Ámbito del estudio, identificación y antibiograma.	67
2. Extracción y análisis de lípidos.....	69
2.1 Análisis preliminar de la composición de lípidos en medio Mueller-Hinton sólido 24h.....	69
2.2 Estudio de la influencia de daptomicina en la composición de lípidos	71
3. Análisis de ácidos grasos.....	73
4. Distribución de los grupos acilo en los lípidos de membrana	74
5. Análisis estadístico de la composición lipídica	74
6. Secuenciación masiva y análisis bioinformático de los cromosomas de algunos aislados	75
7. Confirmación de las variantes (SNPs) detectadas en la secuenciación de los cromosomas: extracción de ADN, amplificación y secuenciación de genes.	76
8. Estudio del grosor de la envoltura celular	78
9. Análisis de imagen	79
RESULTADOS.....	80
<i>Staphylococcus aureus</i>	81
1 Sensibilidad antibiótica	81
2. Composición general de lípidos en los cinco aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> (24h MH agar)	83
2.1 ESI-TOF-MS	83
2.2 GC-MS	87
3 Influencia de daptomicina en la composición lipídica de <i>S. aureus</i>	90
3.1 ESI-TOF-MS	90
3.2 GC-MS	92

4 Estudio del grosor de la envoltura celular de SA1 y SA2	95
5 Secuenciación del cromosoma de <i>S. aureus</i> y análisis bioinformático.....	96
<i>Staphylococcus capitis</i>	98
1 Sensibilidad antibiótica	98
2 Composición general de lípidos en los cuatro aislados de <i>Staphylococcus capitis</i> (24h MH agar)	100
2.1 ESI-TOF-MS	100
.....	104
2.3 GC-MS	104
3 Influencia de daptomicina en la composición lipídica de <i>S. capitis</i>	107
3.1 ESI-TOF-MS	107
3.2 Distribución de los grupos acilo entre los distintos lípidos de membrana .	109
3.3 GC-MS	110
3.4 ESI-TOF-MS/MS	113
4 Estudio del grosor de la envoltura celular de SC32 y SC35.....	114
5 Secuenciación del cromosoma de <i>S. capitis</i> y análisis bioinformático	115
DISCUSIÓN	117
<i>Staphylococcus aureus</i>	119
Población heterogénea en <i>S. aureus</i>	119
Composición lipídica y resistencia a daptomicina	120
Influencia de daptomicina en la composición lipídica	121
Variaciones genéticas.....	122
Efecto “seesaw” y mutación en <i>mprF</i>	124
<i>Staphylococcus capitis</i>	126
Relación entre el tratamiento con vancomicina y la aparición de resistencia a daptomicina	126

Composición lipídica y resistencia a daptomicina	127
Influencia de daptomicina en la composición lipídica	129
Variaciones genéticas.....	129
CONCLUSIONES.....	133
<i>S. aureus</i>	134
<i>S. capitis</i>	134
BIBLIOGRAFÍA	135
APÉNDICE.....	161
Secuencias de aminoácidos de los genes mutados en SA2	162
<i>mprF</i>	162
<i>purR</i>	162
<i>Ebhb1</i>	162
Secuencias de aminoácidos de los genes mutados en SC35	164
<i>tlyC</i>	164
<i>dhbC</i>	164
<i>Rnj2</i>	164
<i>qacB</i>	165
Cadena I de ATP sintasa	165

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

µg/ml: Microgramos/mililitro

µl: Microlitro

ACP: proteína transportadora de grupos acilo

AF: Ácido fosfatídico

AGL: Ácidos grasos libres

ALT: Ácidos lipoteicoicos

AT: Ácidos teicoicos de pared

BORSA: "Borderline oxacillin resistant *S. aureus*"

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CoA: Coenzima A

DAG: Diacilglicerol

DAP: Daptomicina

DHA: "Drug H⁺ antiporter"

DNTPs: Desoxinucleósido trifosfato

DPG: Difosfatidilglicerol

ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina

ESI-TOF-MS: "Electrospray -Time of Flight - Mass Spectrometry"

EUCAST: "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing"

FDA: "Food and Drug Administration"

Fnbp: "Fibronectin-binding protein"

G3P: Gliceroltrifosfato

GC-MS: "Gas Chromatography – Mass Spectrometry"

GL: Diglicosildiácilglicerol, glicolípido

ABREVIATURAS

HPLC: “High performance liquid chromatography”

hSAIV: *Staphylococcus aureus* intermedio heterogéneo a vancomicina

IgG: Inmunoglobulinas G

IN: Intensidad normalizada

LPG: Lisilfosfatidilglicerol

MFM: Microdominios funcionales de membrana

mL/min: Mililitro/minuto

mM: Milimolar

MSCRAMM: “Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”

NAG: N-acetilglucosamina

NAM: N-acetilmurámico

NEAT: “Near iron transporter”

ng/ μ l: Nanogramos/microlitro

PCAs: Péptidos catiónicos antimicrobianos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pb: Pares de bases

PBP: “Penicillin binding protein”

PG: Fosfatidilglicerol

PGT: Peptidoglicano-glicosiltransferasa

PLD: Fosfolipasa

ppm: Partes por millón

Q – TOF: Cuadrupolo de tiempo de vuelo

rpm: Revoluciones por minuto

ABREVIATURAS

SAIV: *Staphylococcus aureus* intermedio a vancomicina

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SARP: *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina

SARV: *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina

SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina

SCCmec: “staphylococcal cassette chromosome *mec*”

SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativos

SCP: *Staphylococcus* coagulasa positivos

SNPs: “Single Nucleotide Polymorphisms”

TIC: “Total Ion Chromatogram”

UCIs: Unidad de Cuidados Intensivos

UCINs: Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos

v/v: Volumen/Volumen

v/v/v: Volumen/Volumen/Volumen

GUIA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

- Figura 1.** Cultivo de *Staphylococcus aureus* en medio agar sangre (imagen propia). ... 25
- Figura 2.** Clasificación clínica y epidemiológica del género *Staphylococcus* basada en la presencia del enzima coagulasa. Basado en (Becker et al., 2014). 26
- Figura 3.** Estructura química básica del peptidoglicano. Imagen de elaboración propia basada en (Vollmer, Blanot, & De Pedro, 2008). 32
- Figura 4.** Esquema de biosíntesis del peptidoglicano. Abreviaturas: UDP-NAG: Uridin-difosfato N-acetilglucosamina, UDP-NAM: Uridin-difosfato N-acetilmurámico, UDP-NAM-L-Ala: Uridin-difosfato N-acetilmurámico- L-alanina, UDP-NAM-L-Ala-D-Glu: Uridin-difosfato N-acetilmurámico- L-alanina-D-glucosa, UDP-NAM-L-Ala-D-Glu-meso: Uridin-difosfato N-acetilmurámico- L-alanina-D-glucosa-ácido mesodiaminopimélico, UDP-NAM-L-Ala-D-Glu-meso-D-ala-D-ala: Uridin-difosfato N-acetilmurámico- L-alanina-D-glucosa-ácido mesodiaminopimélico-D-alanina-D-alanina. Basado en (Rajagopal & Walker, 2017). 33
- Figura 5.** Estructura básica de los ácidos teicoicos. Imagen de elaboración propia obtenida con el programa ChemSketch basada en (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014). 34
- Figura 6.** Estructura química básica de los ácidos lipoteicoicos. Imagen de elaboración propia basada en (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014) 35
- Figura 7.** Esquema de la biosíntesis de los ácidos teicoicos. Abreviaturas: UDPNAG: Uridinadifosfato N-acetilglucosamina; Undecaprenilfosfato-NAG: Undecaprenilfosfato-N-acetilglucosamina; UTP-Man-Nac: Uridinatrifosfato-Manosamina; Undecaprenilfosfato-ManNac: undecaprenilfosfato-manosamina; G3P: Gliceroltrifosfato; CTP: citidinatrifosfato; CDP-Glicerol: citidinadifosfato-Glicerol; Undecaprenildifosfato-NAG-ManNac-P-Glicerol: Undecaprenildifosfato-N-acetilglucosamina-manosamina-glicerolfosfato (Singh, Chang, Coffman, & Kim, 2017)36
- Figura 8.** Estructura química de los componentes principales de la envoltura celular bacteriana a) PG, b) LPG y c) DPG. Figuras de elaboración propia con el programa ChemSketch basado en (Slavetinsky, Kuhn, & Peschel, 2017). 39
- Figura 9.** Estructura química de: a) Diglicosildiácilglicerol (GL). Imagen propia obtenida con el programa ChemSketch basada en (Hauksson, Rilfors, Lindblom, & Arvidson, 1995)

y b) Diacilglicerol (DAG). Imagen de elaboración propia obtenida con el programa ChemSketch basada en (Eichmann & Lass, 2015). 40

Figura 10. Estructura química del ácido graso pentadecanoico (C15): a) lineal, b) iso-ramificado, c) anteiso-ramificado. Imágenes de elaboración propia obtenidas con el programa ChemSketch basadas en (Cronan & Thomas, 2009). 40

Figura 11. Ruta de síntesis de los componentes de la envoltura celular bacteriana. Abreviaturas: PtdOH: Ácido fosfatídico; CDP-DAG: citidindifosfato-diacilglicerol; PG-P: fosfatidilglicerol-fosfato; PG: fosfatidilglicerol; DPG: difosfatidilglicerol; LPG: lisil-fosfatidilglicerol; LTA: ácidos lipoteicoicos; GL: glicolípido; DAG: diacilglicerol; CTP: citidintrifosfato. Basado en (Kuhn et al., 2015) 41

Figura 12. Esquema de la biosíntesis de ácidos grasos. Abreviaturas: CoA: coenzima A; ACP: proteína transportadora de acilos. Basado en (Freiberg et al., 2004; Morvan et al., 2017). 42

Figura 13. Evolución de la resistencia a distintos antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Basado en (McGuinness, Malachowa, & DeLeo, 2017). 45

Figura 14. Estructura química de: a) penicilina, b) cefalosporinas, c) carbapenems, d) monobactámicos y e) ácido clavulánico. Imágenes de elaboración propia realizada con el programa ChemSketch basada en (Suárez & Gudíol, 2009; Vincent & Amar, 2002). 46

Figura 15. Estructura química de: a) vancomicina y b) teicoplanina, dos antibióticos glucopéptidos. Fuente Wikipedia. 48

Figura 16. Estructura química de dalbavancina. Fuente Wikipedia. 50

Figura 17. Estructura química de linezolid. Imagen de elaboración propia con el programa ChemSketch basada en (Douros, Grabowski, & Stahlmann, 2015). 51

Figura 18. Estructura química de daptomicina (Casanova, Ruiz & Bellido. 2017). 52

Figura 19. Mecanismo de acción de daptomicina sobre la membrana plasmática bacteriana. Imagen de elaboración propia basada en (Miller et al., 2016). 53

Figura 20. Esquema de la estructura enzimática de *mprF*. Se resaltan en color naranja las mutaciones más frecuentes relacionadas con la resistencia a daptomicina. Imagen de elaboración propia basada en (Ernst & Peschel, 2019). 57

Figura 21. Estructura esquemática de la enzima cardiolipina sintasa. Imagen de elaboración propia basada en (Koprivnjak et al., 2011). 59

Figura 22. Secuencia de aislamientos de *S. aureus* en el paciente. 67

Figura 23. Secuencia de aislamientos de <i>S. capitis</i> en el paciente	68
Figura 24. Ejemplo de E-test realizado a SA2 de daptomicina y oxacilina. Imagen propia.	82
Figura 25. Ejemplos de espectros obtenidos por ESI-TOF-MS en la cepa SA2, donde se muestran: a) espectro general, b) PG, c) LPG y GL d) DPG, e) DAG, f) AGL.	86
Figura 26. Comparación, relativa a SA1, de la composición de lípidos de los distintos aislados de <i>S. aureus</i> cultivados en MH agar 24h	87
Figura 27. Ejemplo de cromatograma (ácidos grasos) obtenido mediante GC-MS del aislado SA2 en medio Mueller-Hinton agar.	88
Figura 28. Composición lipídica de los aislados SA1 en medio líquido, en ausencia (control, C) y presencia de daptomicina (D). Para la comparación de cada uno de los lípidos se toman como referencia el control a las 4h (C4H) <i>versus</i> daptomicina 4h (D4H) y el control a las 24h (C24H) <i>versus</i> daptomicina 24H (D24H).....	90
Figura 29. Composición lipídica de SA2 en medio líquido, en ausencia (control, C) y presencia de daptomicina (D). Para la comparación de cada uno de los lípidos se toman como referencia el control a las 4h (C4H) <i>versus</i> daptomicina 4h (D4H) y el control a las 24h (C24H) <i>versus</i> daptomicina 24H (D24H).....	91
Figura 30. Composición lipídica de SA2 <i>versus</i> SA1 en medio Mueller-Hinton caldo a las 4h de cultivo: a) ausencia de daptomicina, b) presencia de daptomicina.	91
Figura 31. Composición lipídica de SA2 <i>versus</i> SA1 en medio Mueller-Hinton caldo a las 24h de cultivo: a) ausencia de daptomicina, b) presencia de daptomicina.	92
Figura 32. Microscopía electrónica de transmisión de: a) SA1 y b) SA2.	96
Figura 33. Ejemplo de E-test® a daptomicina realizado al aislado SC32.....	99
Figura 34. Ejemplos de espectros obtenidos por ESI-TOF-MS en la cepa SC32, donde se muestran: a) espectro general, b) GL, PG y LPG, c) DPG, d) GL y GP-GL, e) AGL.	102
Figura 35. Comparación de la composición de lípidos de los aislados SC33, SC34 y SC35 con respecto al control SC32.....	103
Figura 36. Relación entre las intensidades de las especies moleculares mayoritarias de los lípidos de los distintos aislados de <i>S. capitis</i> en medio MH agar a las 24h de cultivo.	104
Figura 37. Ejemplo de cromatograma obtenido mediante GC-MS del aislado SC32. .	105

FIGURAS

Figura 38. Composición lipídica de la membrana bacteriana de SC32 en medio líquido en ausencia (control) y presencia de daptomicina, a) 4h de cultivo, b) 24h de cultivo. Los resultados se expresan comparando daptomicina <i>versus</i> control.....	107
Figura 39. Composición lipídica de SC35 en medio líquido en ausencia (control) y presencia de daptomicina, a) 4h de cultivo, b) 24h de cultivo. Los resultados se expresan comparando daptomicina <i>versus</i> control.....	107
Figura 40. Composición lipídica de SC35 <i>versus</i> SC32 en medio Mueller-Hinton caldo a las 4h de cultivo en: a) ausencia de daptomicina, b) presencia de daptomicina.....	108
Figura 41. Composición lipídica de SC35 <i>versus</i> SC32 en medio Mueller-Hinton caldo a las 24h de cultivo en: a) ausencia de daptomicina, b) presencia de daptomicina.....	108
Figura 42. Relación entre las especies moleculares mayoritarias de los lípidos de SC32 y SC35 a 4h de cultivo en: a) ausencia de daptomicina (C), b) epresencia de daptomicina (D).	109
Figura 43. Relación entre las especies moleculares mayoritarias de los lípidos de SC32 y SC 35 a 24h de cultivo en: a) ausencia de daptomicina (C), b) en presencia de daptomicina (D).	110
Figura 44. Espectro MS/MS de PG (m/z 721) de SC32, ilustrando el hecho de que los grupos acilo (ácidos grasos) mayoritarios de los lípidos de membrana se corresponden con los ácidos grasos de cadena impar C15 y C17.	114
Figura 45. Microscopía electrónica de: a) SC32, b) SC35	115
Figura 46. Esquema de la teoría de repulsión. En rojo se muestran las moléculas de LPG y en azul las de PG. Imagen de elaboración propia basada en (Peleg et al., 2012)	124
Figura 47. Modelo propuesto de la implicación de mprF en el efecto “seesaw”. En verde se representa el LPG y en azul PG. Imagen de elaboración propia basada en (Renzoni et al., 2017a).	125
Figura 48. Esquema del funcionamiento del complejo degradosoma en <i>S. aureus</i> . Imagen de elaboración propia basado en (Redder, 2018).	131
Figura 49. Mutación en <i>mprF</i> de SA2 con respecto a SA1 y la cepa de referencia.....	162
Figura 50. Mutación de <i>rnj2</i> en SC35 con respecto a SC32 y la cepa de referencia....	164
Figura 51. Mutación de <i>qacB</i> en SC35 con respecto a SC32 y la cepa de referencia ..	165

Tablas

Tabla 1. Genes asociados al fenotipo de sensibilidad reducida a vancomicina.....	49
Tabla 2. Genes asociados con la aparición de resistencia a daptomicina.	56
Tabla 3. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de PG presentes en <i>S. capitis</i> y <i>S. aureus</i>	71
Tabla 4. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de DPG presentes en <i>S. capitis</i> y <i>S. aureus</i>	71
Tabla 5. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de LPG presentes en <i>S. capitis</i> y <i>S. aureus</i>	72
Tabla 6. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de GL presentes en <i>S. capitis</i> y <i>S. aureus</i>	72
Tabla 7. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de DAG presentes en <i>S. capitis</i> y <i>S. aureus</i>	72
Tabla 8. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de GP-GL presentes en <i>S. capitis</i> y <i>S. aureus</i>	73
Tabla 9. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de AGL presentes en <i>S. capitis</i> y <i>S. aureus</i>	73
Tabla 10. “Primers” utilizados para comprobar las mutaciones observadas por secuenciación masiva en los aislados de <i>S. capitis</i>	78
Tabla 11. “Primers” utilizados para comprobar las mutaciones observadas por secuenciación masiva en los aislados de <i>S. aureus</i>	78
Tabla 12. Antibiograma (Vitek2®) de las diferentes cepas de <i>S. aureus</i> , e interpretación de los resultados (S: sensible y R: resistente). La concentración se expresa en µg/mL. Se destaca en negrita la CMI obtenida para el antibiótico daptomicina en todos los aislados.	81
Tabla 13. Comparación entre los resultados obtenidos mediante los métodos Vitek® y E-test® en los aislados de <i>S. aureus</i> . La concentración se expresa en µg/mL.....	82
Tabla 14. Composición (%) de ácidos grasos de los cinco aislados de <i>S. aureus</i> estudiados a las 24h de cultivo en medio sólido.	89
Tabla 15. Porcentaje de los diferentes tipos estructurales de ácidos grasos analizados en las cinco cepas de <i>S. aureus</i> estudiadas.	90

Tabla 16. Composición de ácidos grasos, expresada en porcentaje, del aislado SA1 en ausencia (control) y presencia de daptomicina, a 4h y 24h de cultivo. 93

Tabla 17. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de SA1 en ausencia (C) y presencia de daptomicina (D), a 4h y 24h. 94

Tabla 18. Composición de ácidos grasos, expresada en porcentaje, de SA2 en ausencia (control) y presencia de daptomicina, a 4h y 24h de cultivo. 94

Tabla 19. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de SA2 en ausencia (C) y presencia de daptomicina (D), a 4h y 24h. 95

Tabla 20. Mutaciones encontradas en la secuenciación del cromosoma de SA2 con respecto a SA1. 97

Tabla 21. Antibiograma (Vitek2®) de las diferentes cepas de *S. capititis*, e interpretación de los resultados (S: sensible y R: resistente). La concentración se expresa en µg/mL. Se destaca en negrita la CMI obtenida para el antibiótico daptomicina en todos los aislados. 98

Tabla 22. Comparación entre los resultados obtenidos mediante los métodos Vitek® y E-test® en los aislados de *S. capititis*. La concentración se expresa en µg/mL. 99

Tabla 23. Composición (%) de ácidos grasos de los cuatro aislados de *S. capititis* estudiados. 106

Tabla 24. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de *S. capititis*. 106

Tabla 25. Composición (%) de ácidos grasos de SC32 en ausencia (control) y presencia de daptomicina tras 4h y 24h de cultivo. 111

Tabla 26. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de SC32 en ausencia (C) y en presencia de daptomicina (D) a 4h y 24h de cultivo. 111

Tabla 27. Composición (%) de ácidos grasos de SC35 en ausencia (C) y presencia de daptomicina (D) a 4h y 24h de cultivo. 112

Tabla 28. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de SC32 en ausencia (C) y en presencia de daptomicina (D) a 4h y 24h de cultivo. 113

Tabla 29. Mutaciones detectadas en el cromosoma de SC35. 116

RESUMEN

Resumen

Daptomicina es un antibiótico lipopeptídico activo frente a bacterias Gram-positivas y utilizado, principalmente, en el tratamiento de infecciones complicadas producidas por *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium* multirresistentes. Su mecanismo de acción, dependiente de iones Ca^{2+} , no es del todo conocido, aunque está clara la interacción del antibiótico con fosfatidilglicerol, lípido mayoritario de membrana en estos microorganismos.

La resistencia a daptomicina es un hecho poco frecuente y se ha asociado al tratamiento con este antibiótico de infecciones causadas por *S. aureus*. Los mecanismos moleculares de resistencia se han relacionado con genes implicados en la síntesis de diversos componentes de la envoltura celular y en aquellos relacionados con la homeostasis de la misma, como *mprF* (formación de lisilfosfatidilglicerol), *cls2* (síntesis de cardiolipina), *yycFG* (síntesis de peptidoglicano), *vraSR* (regulación de la síntesis de la pared), *graSR* (regulador de la carga neta de la envoltura celular), etc.

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia de la composición lipídica en la resistencia a daptomicina y en los mecanismos moleculares relacionados con la misma, en aislados clínicos seriados de *S. aureus* y *S. capitis*, obtenidos en un mismo paciente que durante el curso de un proceso infeccioso modificaron su sensibilidad al antibiótico a lo largo del tratamiento. *S. capitis*, considerado tradicionalmente como contaminante, ha surgido en los últimos años como un patógeno nosocomial importante, sobre todo en UCIs neonatales. La composición lipídica se estudió mediante espectrometría de masas con ionización mediante “electrospray” y análisis por tiempo de vuelo (ESI-TOF) y se secuenciaron los cromosomas de parejas de cepas sensible/resistente de ambas especies para estimar los cambios genéticos (mutaciones) entre ellas, que fueron confirmados por PCR y secuenciación de Sanger. En las parejas sensible/resistente se estudió la composición lipídica en presencia y ausencia de daptomicina y se analizó el grosor de pared mediante microscopía electrónica de transmisión.

En *S. aureus* se demostró que la cepa resistente difería en su perfil lipídico del resto de aislados estudiados por su mayor contenido en lisilfosfatidilglicerol (LPG), un

RESUMEN

fosfolípido catiónico. Esta característica se acompañó de la mutación P314L en la proteína MprF, implicada en la síntesis del fosfolípido. También se observaron mutaciones en el gen *purR*, regulador del metabolismo de purinas y la adhesina Emb, así como una deleción en una proteína hipotética. La pareja de cepas sensible/resistente de *S. aureus* no adaptó su composición lipídica a la presencia de antibiótico y tampoco se encontraron variaciones en el grosor de la envoltura celular, por lo que se consideró que la resistencia a daptomicina en el aislado resistente estudiado podría relacionarse con la mutación P314L.

Las cepas resistentes de *S. capitis* mostraron importantes variaciones lipídicas en relación con la cepa sensible de esta especie, destacando en aquellas su bajo contenido en LPG y un gran incremento de diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres (AGL). El análisis cromosómico de la pareja sensible/resistente evidenció hasta ocho mutaciones en la cepa resistente, destacando las relacionadas con *rnJ2*, ribonucleasa del complejo degradosoma, y *qacB*, gen relacionado con el transporte de iones amonio, pero ninguna de ellas implicadas de manera directa en la síntesis de lípidos ni en la regulación de la homeostasis de la envoltura celular. Además, se observó que la cepa resistente mostró un notable incremento del grosor de la envoltura celular. Se comprobó que *S. capitis* no adapta su composición lipídica a la presencia de daptomicina en el medio de cultivo y que la cepa tiene, como promedio, dos carbonos más en los grupos acilo de sus lípidos de membrana, cuando se compara con la cepa sensible. En *S. capitis*, la resistencia a daptomicina tiene un reflejo importante en los lípidos de membrana y en el grosor de la pared, sin que cambien los genes implicados en la síntesis y homeostasis de la envoltura celular, algo que puede considerarse inédito en el ámbito de la resistencia a este antibiótico.

Abstract

Daptomycin is a lipopeptide antibiotic with specific activity against Gram-positive organism and used in treatment of complicated infections caused by Gram-positive bacteria, particularly multiresistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*. Its mechanism of action, depending on calcium ions, is not fully understood, but it is clear its interaction with phosphatidylglycerol, majority lipid in these bacterial membranes.

Daptomycin resistance is a rare event, associated with treatments of *S. aureus* infections. The molecular mechanism of this resistance has been related with genes involved with the synthesis and homeostasis of the cell envelope, such as *mprF* (synthesis of lilylphosphatidylglycerol), *cls2* (synthesis of cardiolipin), *yycFG* (synthesis of peptidoglycan), *vraSR* (regulator of the cell wall synthesis), *graSR* (regulator of the cell envelope charge), etc.

In this work we have studied the influence of the lipid composition in the daptomycin resistance and in the molecular mechanisms related with this resistance in serial clinical isolates of *S. aureus* and *S. capitis*, got each one of the same patient, that changed their antibiotic susceptibility during the infection. *S. capitis*, considered as a contaminating microorganism, has emerged in recent years as an important nosocomial pathogen, especially in neonatal ICUs. The lipid composition was studied by mass spectrometry with electrospray ionization and it was analysed by time of fly (ESI-TOF), and we sequenced the chromosome of couples of strains susceptible/resistant of both species to estimate the genetic changes (mutations) between them, checked by PCR and Sanger sequencing. In this couples we studied the lipid composition in presence and absence of daptomycin and we analysed the thickness of the cell wall by transmission electron microscopy.

In *S. aureus* we demonstrated the resistant strain differed from the rest of the isolates in his high content of lilylphosphatidylglycerol (LPG), a cationic phospholipid. This characteristic was accompanied by the P314L mutation in MprF, protein involved in the synthesis of this phospholipid. We also observed mutations in *purR*, regulator of the purine metabolism, in the Emb adhesin, and a deletion in an hypothetical protein. The

ABSTRACT

susceptible/resistant couple didn't adapt his lipid composition to the presence of the antibiotic, and we didn't observe variation into the thickness cell envelope, which is why we considered that the resistance observed in *S. aureus* could be related con the mutation P314L.

The resistant strains of *S. capitis* showed important lipid variations compared to the susceptible strain, standing out the low content of LPG and an increase of diacylglycerol (DAG) and free fatty acids (AGL). The chromosomic analysis of the susceptible/resistant couples showed eight mutations in the resistant strain, highlighting the mutations observed in *rnJ2*, ribonuclease of the degradosome complex, and *qacB*, gen related with the transport of ammonium ions, but neither of this mutations have been related directly with the lipid synthesis or the homeostasis of the cell envelope. We observed as well that the resistant strain showed an increase of the thickness cell envelope. We checked that both susceptible and resistant strains did not

adapt his lipid composition to the presence of the antibiotic in the culture, and this strain had two more carbons in his acyl groups than the susceptible strain. In *S. capitis*, the daptomycin resistance has a great influence by the lipid membrane composition, without any changes in the genes related with his synthesis or homeostasis, something that we could consider unique in the resistance to this antibiotic.

INTRODUCCIÓN

1. Género *Staphylococcus*.

Staphylococcus es un género de bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas, con bajo contenido en guanina y citosina en su ADN incluido taxonómicamente en el linaje Firmicutes, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, familia *Staphylococcaceae*. Microscópicamente presentan morfología de cocos de entre 0,5 y 1,5 μm de tamaño que pueden dividirse en tres planos, lo que hace que se presenten en agrupaciones con aspecto de racimos de uva, aunque también pueden asociarse en parejas, tétradas o cadenas cortas. Estos microorganismos producen el enzima catalasa, lo que permite distinguirlos de bacterias del género *Streptococcus*. En general, forman colonias elevadas, de 1-2mm de diámetro. Algunas especies como *Staphylococcus aureus* son β -hemolíticas y producen pigmentos tras varios días de incubación, lo que facilita su identificación en cultivo (Fig. 1) (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2014).

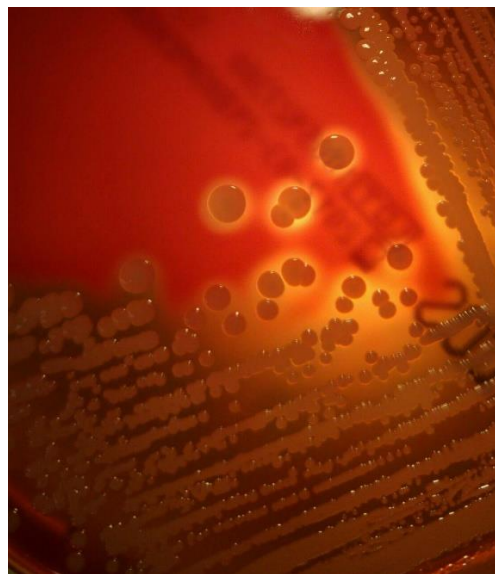


Figura 1. Cultivo de *Staphylococcus aureus* en medio agar sangre (imagen propia).

En este género se incluyen 47 especies y 23 subespecies, aunque la mayoría no son patógenas y forman parte de la flora comensal de piel y mucosas de mamíferos y aves (Becker, Heilmann, & Peters, 2014), ejerciendo el papel de barrera defensiva fundamental, ya que actúan regulando la carga de patógenos en la superficie de esta (Kumar, Jangir, Das, Taneja, & Sharma, 2017).

Se han propuesto diferentes clasificaciones para categorizar a los miembros del género *Staphylococcus*. Una de las más utilizadas desde un punto de vista clínico y epidemiológico se basa en la producción del enzima coagulasa, activador de protrombina, que interviene en el proceso de coagulación de la sangre y es un importante factor de virulencia. Esta característica permite separar a las especies de este género en dos grupos (Fig. 2): los estafilococos coagulasa positivos (SCP), representados principalmente por la especie *Staphylococcus aureus*, el patógeno por excelencia de este género, y los estafilococos coagulasa negativos (SCN), que incluyen especies como *S. epidermidis* o *S. capitis*, entre otros.

Recientemente, y basada en datos moleculares, secuenciación del gen del ARNr 16S y de los genes *dnaJ*, *rpoB* y *tuf*, se ha redefinido la clasificación del género *Staphylococcus* en 15 grupos. Las especies clínicamente relevantes están incluidas en 6 de estos grupos (*auricularis*, *hyicus-Intermedius*, *epidermidis-aureus*, *saprophyticus*, *simulans* y *sciuri*) (Becker et al., 2014).

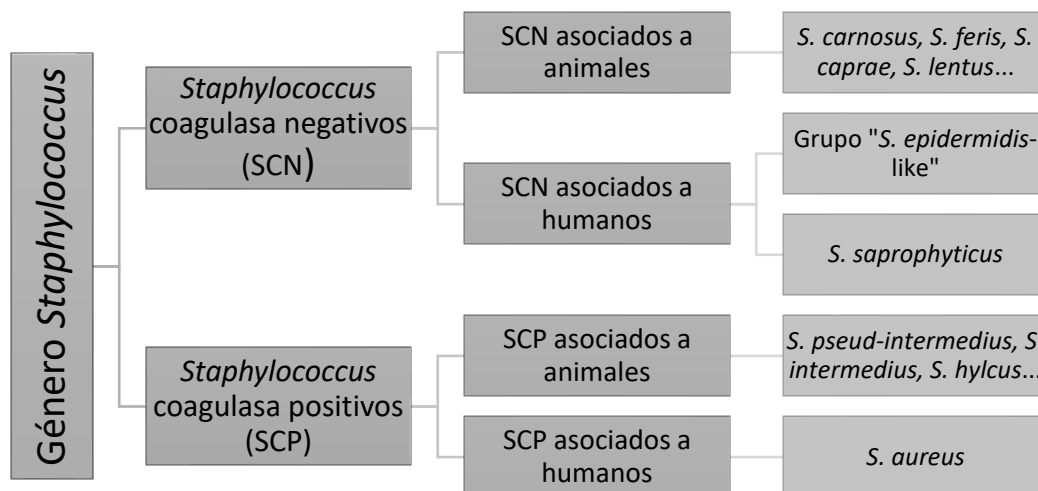


Figura 2. Clasificación clínica y epidemiológica del género *Staphylococcus* basada en la presencia del enzima coagulasa. Basado en (Becker et al., 2014).

La patogenia de las infecciones por *S. aureus* es un fenómeno complejo en el que intervienen tanto factores de virulencia de la bacteria como la situación de las defensas del huésped. Entre los factores de patogenicidad de esta especie se encuentran tanto productos estructurales como secretados, exoenzimas y toxinas, que pueden ser

INTRODUCCIÓN

expresados por este microorganismo y favorecen la invasión tisular y diseminación en los tejidos del huésped (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015).

A diferencia de *S. aureus*, los SCN se han caracterizado por su escaso poder patógeno y, prácticamente, la ausencia de factores de virulencia. Su capacidad infectiva procede, principalmente, de su poder de formación de biopelículas (Becker et al., 2014). Durante mucho tiempo se han considerado microorganismos comensales no patógenos, atribuyéndose su aislamiento en muestras clínicas a la contaminación de éstas con flora cutánea (Pereira et al., 2020). Sin embargo, hace aproximadamente tres décadas, comienza a plantearse su papel como patógenos oportunistas, especialmente en pacientes con alteraciones de los mecanismos de defensa, llegando a ser considerados en la actualidad como uno de los principales patógenos nosocomiales, produciendo infecciones con un impacto importante en la salud humana (Fariña et al., 2013; Pfaller & Herwaldt, 1988).

Se les considera los principales agentes etiológicos de un amplio espectro de infecciones nosocomiales tales como endocarditis, osteomielitis, endoftalmitis postquirúrgica y bacteriemias, la mayoría de ellas asociadas al uso de dispositivos artificiales sanitarios, como catéteres intravenosos, de diálisis peritoneal y válvulas cardíacas, entre otros, indispensables en la medicina moderna (Casey, Lambert, & Elliott, 2007; Chu et al., 2004; Kloos, 1980). La colonización de estos dispositivos por SCN procedentes de la piel y mucosas del huésped es el origen de estas infecciones endógenas y lleva, en muchas ocasiones, a la necesidad de su retirada, lo que supone un importante problema tanto médico como económico. El principal patógeno de este grupo es *S. epidermidis* (Becker et al., 2014).

Las biopelículas (o biofilms) bacterianas son comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos, adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Suresh, Biswas, & Biswas, 2019). La formación de esta estructura sobre la superficie de los dispositivos médicos permite que las bacterias se adhieran de manera irreversible, además de que las protege de la acción de los antibióticos y de la respuesta inmune del huésped, por lo que la erradicación de las infecciones causadas con microorganismos formadores de biopelículas es compleja y difícil de tratar, y suele

necesitar el reemplazo del dispositivo infectado (Moormeier & Bayles, 2017; Oliveira et al., 2018).

2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es la especie patógena por excelencia del género *Staphylococcus*. Es un microorganismo mesófilo, anaerobio facultativo, capaz de fermentar la glucosa. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 30 °C y los 37 °C

Este microorganismo puede existir como miembro residente o transitorio de la flora normal de piel y mucosas, mostrando preferencia por la región anterior de las fosas nasales, en especial en adultos (Kluytmans, van Belkum, & Verbrugh, 1997). El 30% de la población se encuentra colonizada por *S. aureus*. (Tong et al., 2015). La tasa de colonización más alta se produce en ciertas poblaciones, como en enfermos con forunculosis recurrente o pacientes sometidos a procedimientos médicos como hemodiálisis o cirugía, etc. (Von Eiff, Becker, Machka, Stammer, & Peters, 2001). La hospitalización es otro factor de riesgo en la colonización. Según algunos estudios, tras dos semanas de ingreso hospitalario la tasa de colonización llega a aumentar hasta un 50% (Kluytmans et al., 1997).

S. aureus es un patógeno importante y una de las principales causas de infección en el ser humano. Estas infecciones suelen ocurrir tras lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la penetración del microorganismo desde la piel hasta los tejidos profundos. En ocasiones, aunque inicialmente son cuadros localizados (infecciones de piel y partes blandas), pueden diseminarse y ser origen de infecciones graves como bacteriemias, endocarditis, infecciones intravasculares, osteomielitis o neumonía, además de producir un elevado número de infecciones relacionadas con la utilización de catéteres, prótesis y otros dispositivos médicos. Pueden ser tanto de adquisición comunitaria como nosocomial (Klebens et al., 2006).

Otra característica importante de este microorganismo es la alta capacidad para desarrollar y acumular mecanismos de resistencia a antibióticos. *S. aureus*, junto con *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*

INTRODUCCIÓN

aeruginosa y *Enterobacter*, se han clasificado como grupo “ESKAPE” por su alta capacidad de adquirir resistencia a antibióticos, generando un importante problema de salud pública (Rashid & Kline, 2017).

Tan solo cuatro años después del descubrimiento y aplicación terapéutica de las primeras penicilinas en 1940, hasta un 60% de las cepas de *S. aureus* habían adquirido resistencia a estos fármacos por la producción de β -lactamasas (Cameron, Howden, & Peleg, 2011).

Durante la década de 1950 se fueron introduciendo nuevos antibióticos en la práctica clínica (tetraciclina, estreptomina, cloranfenicol, eritromicina), notificándose los primeros aislamientos clínicos de *S. aureus* multiresistentes en 1957. A principios de 1960 los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles. En 1959 se introduce la metilina, una penicilina semisintética que resiste la acción de la β -lactamasa que degrada la penicilina. En 1961 aparecieron las primeras resistencias mediadas por adquisición del gen *mecA* implicado en la resistencia a metilina (Deurenberg et al., 2007; Hiramatsu, Cui, Kuroda, & Ito, 2001; Rodríguez-Baño & Paterson, 2006).

Las cepas de *S. aureus* resistente a metilina (SARM) son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos, excepto a las cefalosporinas de última generación. Suelen estar implicadas en infecciones y brotes nosocomiales y requieren tratamientos prolongados de antibióticos, con gran coste y mal pronóstico.

Durante años, el tratamiento contra SARM han sido los antibióticos de naturaleza glucopeptídica, como vancomicina o teicoplanina, pero en 1997 se describe en Japón el primer aislado de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a la vancomicina (SAIV) (Hiramatsu et al., 1997), aunque hasta el año 2002 no se describen cepas de SARM con resistencia de alto nivel (SARV) provocada por la transferencia “in vivo” de plásmidos. A pesar de que son raros los aislamientos de SARV, la prevalencia de SAIV y la de cepas con resistencia heterogénea a este antimicrobiano (hSAIV) han seguido aumentando (Cameron et al., 2011). Esta situación ha llevado a la necesidad de buscar alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por estos microorganismos multiresistentes (Casanova, Ruiz & Bellido. 2017).

Una importante aportación al tratamiento de las infecciones por SARM fue el linezolid, antibiótico perteneciente a la familia de las oxazolidinonas (Bi, Qin, Fan, Ma, & Gu, 2018). Es un antibiótico sintético que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas por su capacidad de unión a las subunidades ribosómicas 30S y 50S. La FDA, “Food and Drug Administration”, aprobó en el año 2000 el uso clínico de linezolid para el tratamiento de neumonías adquiridas en el hospital, así como infecciones de pie diabético sin osteomielitis concomitante causadas tanto por SARM como por *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM) (Belousoff et al., 2017; Hashemian, Farhadi, & Ganjparvar, 2018; Tian et al., 2014).

La creciente resistencia a los antimicrobianos de SARM y otros patógenos Gram-positivos llevó a la necesidad de investigar y desarrollar nuevos antibióticos con actividad frente a estos microorganismos (Gómez Casanova, Siller Ruiz, & Muñoz Bellido, 2017). Entre estos, destaca daptomicina, que interacciona con la membrana celular provocando la muerte bacteriana sin lisis (Baltz, 2009; Heidary et al., 2017; Tran, Munita, & Arias, 2015). En pocos años, este antibiótico se ha convertido en un antimicrobiano esencial en el tratamiento de infecciones causadas por SARM (Miller, Bayer, & Arias, 2016), aunque en la actualidad ya se han descrito clones de *S. aureus* resistentes (Stefani et al., 2015).

3. *Staphylococcus capitis*

Esta especie de SCN está incluida en el grupo “*S. epidermidis* like”. Forma parte de la flora normal de piel y mucosas y se ha considerado, durante mucho tiempo, un microorganismo comensal no patógeno, atribuyéndose su aislamiento en muestras clínicas a la contaminación de éstas con flora cutánea (Becker et al., 2014).

Aunque las infecciones ocasionadas por *S. capitis* son menos frecuentes que las originadas por otros SCN, se ha observado un incremento en los últimos años, emergiendo como un patógeno nosocomial significativo, causante de sepsis, endocarditis sobre válvula protésica, marcapasos o catéteres y sepsis neonatal tardía (Laurent & Butin, 2019). Su patogénesis es debida, principalmente, a la capacidad de producir biopelículas (Al Hennawi, Mahdi, & Memish, 2019; Fukuda, Wada, Yasuda,

Iwasa, & Yamaguchi, 2010; Tevell, Hellmark, Nilsson-Augustinsson, & Söderquist, 2017).

Una de las principales características de los SCN, incluido *S. capitis*, es la resistencia a múltiples antibióticos, debido a la utilización indiscriminada de éstos en el tratamiento, e incluso profilaxis de infecciones nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos (Heilmann, Ziebuhr, & Becker, 2018). En las últimas décadas se ha observado una pérdida progresiva de sensibilidad a diferentes antibióticos, siendo especialmente dramático el incremento en la resistencia a meticilina. El porcentaje de resistencia a meticilina en *S. epidermidis* es del 75-90% en los aislamientos hospitalarios. Además de la resistencia a la meticilina, las cepas de *S. epidermidis* y de otros SCN han adquirido resistencia a otros antibióticos, como rifampicina, fluoroquinonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina y sulfonamidas (Otto, 2009).

El incremento de SCN resistentes a meticilina (Malihe et al., 2016), llevó al uso de vancomicina como principal antibiótico en el tratamiento frente a infecciones causadas por estos microorganismos (Ehlersson, Hellmark, Svartström, Stenmark, & Söderquist, 2017). Recientemente ha sido aislado un clon de *S. capitis* multirresistente en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCINs) de varios países alrededor del mundo, el cual presenta sensibilidad disminuida a los β -lactámicos, aminoglucósidos, vancomicina y linezolid (Butin et al., 2018; Carter et al., 2018; Lemriss et al., 2016; Song et al., 2017). Sin embargo, daptomicina sí es activa frente a este clon.

4. Envoltura celular en el género *Staphylococcus*.

4.1 Peptidoglicano

Como en todos los microorganismos Gram-positivos, la envoltura celular de estas bacterias está formada por una gruesa capa de peptidoglicano, a la que se unen proteínas y otros compuestos.

INTRODUCCIÓN

El peptidoglicano (Fig. 3) es un polímero compuesto por cadenas de N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM) entrecruzadas. La longitud de la cadena de peptidoglicano puede variar según la especie. Esta molécula aporta rigidez a la envoltura celular y define la forma de la bacteria; además, sirve de anclaje para otros componentes de la pared, tales como proteínas y ácidos teicoicos (Santos-Beneit, Ordóñez-Robles, & Martín, 2017).

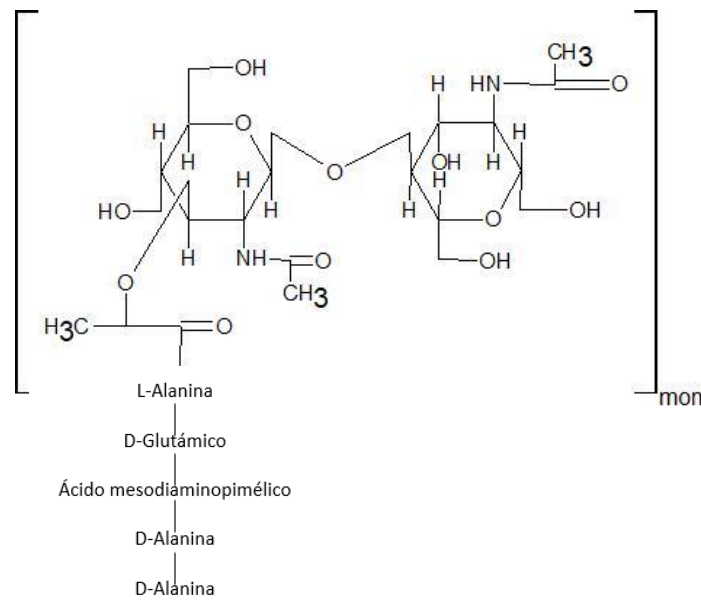


Figura 3. Estructura química básica del peptidoglicano. Imagen de elaboración propia basada en (Vollmer, Blanot, & De Pedro, 2008).

La biosíntesis del peptidoglicano (Fig. 4) comienza en el citoplasma con la formación de los precursores UDP-NAG y UDP-NAM. El primero se sintetiza a partir de fructosa 6-fosfato, reacción catalizada por las enzimas GlmS, GlmM y GlmU, mientras que el segundo se sintetiza por la adición de enolpiruvato a los residuos de UDP-NAG, reacción catalizada por la enzima MurA (Lovering, Safadi, & Strynadka, 2012; Pazos & Peters, 2019). Tras esto, MurB lleva a cabo la reducción de los restos de UDP-NAM (Rajagopal & Walker, 2017). A continuación, las enzimas MurC, MurD, MurE y MurF adicionan el pentapéptido compuesto por L-alanina (L-ala), D-glutámico (D-glu), ácido mesodiaminopimélico (meso), D-alanina y D-alanina (D-ala) (Pazos & Peters, 2019). La proteína MraY, integral de membrana, transfiere las unidades de NAM-L-ala-D-glu-meso-D-ala-D-ala a un transportador de undecaprenil fosfato, generando así el lípido I (Lovering et al., 2012). Después, la enzima MurG transfiere al lípido I una molécula de

INTRODUCCIÓN

NAG para formar el lípido II, liberando una molécula de uridin difosfato (UDP) (Pazos & Peters, 2019).

En una segunda fase se produce la polimerización del lípido II y su posterior entrecruzamiento o “cross-linking”, dando lugar a la molécula madura de peptidoglicano (Rajagopal & Walker, 2017). La polimerización de la molécula la llevan a cabo las peptidoglicano-glicosiltransferasas (PGT). En primer lugar, se produce la unión de dos monómeros de lípido II, formando la molécula de lípido IV. Tras esto, se adicionan de manera sucesiva moléculas de lípido II para la elongación de la molécula (Lovering et al., 2012).

Por otra parte, el entrecruzamiento de las moléculas del peptidoglicano se logra mediante reacciones llevadas a cabo por transpeptidasas conocidas como PBPs “penicillin binding proteins”, llamadas así por su capacidad para unirse a los antibióticos β -lactámicos (Pazos & Peters, 2019). A destacar la participación de la pentaglicina en estas reacciones.

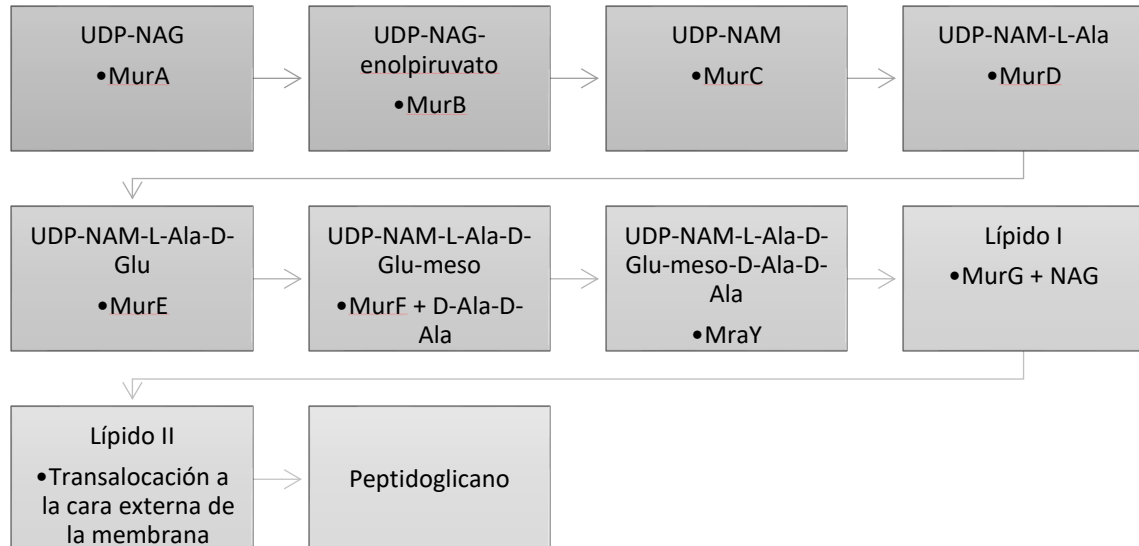


Figura 4. Esquema de biosíntesis del peptidoglicano. Abreviaturas: UDP-NAG: Uridin-difosfato N-acetilglucosamina, UDP-NAM: Uridin-difosfato N-acetilmurámico, UDP-NAM-L-Ala: Uridin-difosfato N-acetilmurámico- L-alanina, UDP-NAM-L-Ala-D-Glu: Uridin-difosfato N-acetilmurámico- L-alanina-D-glucosa, UDP-NAM-L-Ala-D-Glu-meso: Uridin-difosfato N-acetilmurámico- L-alanina-D-glucosa-ácido mesodiaminopimélico, UDP-NAM-L-Ala-D-Glu-

meso-D-ala-D-ala: Uridin-difosfato N-acetilmurámico- L-alanina-D-glucosa-ácido mesodiaminopimélico-D-alanina-D-alanina. Basado en (Rajagopal & Walker, 2017).

4.2 Ácidos teicoicos y lipoteicoicos

Los ácidos lipoteicoicos (ALT) se encuentran anclados a la membrana celular, mientras que los ácidos teicoicos de pared (AT) se unen, mediante enlaces covalentes, al peptidoglicano.

Los AT (Fig. 5) se unen a la pared a través de un disacárido mediante un enlace fosfodiéster, y a partir de ahí presentan una cadena polimérica de composición variable entre las distintas especies. En *S. aureus* está compuesta por restos de glicerol-fosfato y/o ribitol-fosfato (Rajagopal & Walker, 2017), y en la mayoría de cepa de *S. aureus* esta estructura se repite entre 11 y 40 unidades (Xia, Kohler, & Peschel, 2010).

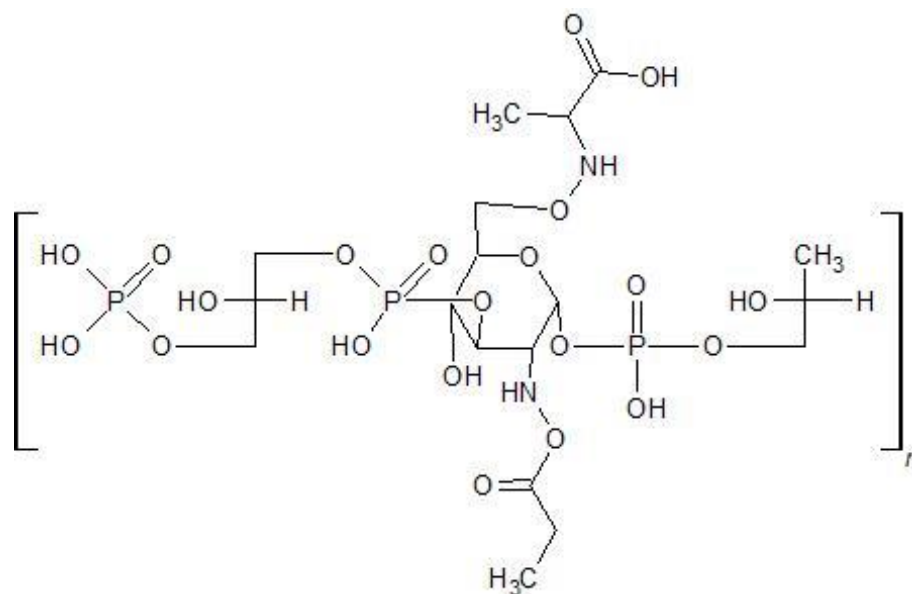


Figura 5. Estructura básica de los ácidos teicoicos. Imagen de elaboración propia obtenida con el programa ChemSketch basada en (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014).

La biosíntesis de los AT comienza de manera similar a la del peptidoglicano con la transferencia al transportador UDP de la molécula de N-acetilglucosamina. Esta molécula sirve como base para la formación de la molécula completa gracias a una serie de enzimas intracelulares (Rajagopal & Walker, 2017). En *S. aureus* su síntesis la llevan a cabo los genes codificados por el operón *tar* (Sewell & Brown, 2013). Una vez que se

INTRODUCCIÓN

ha sintetizado la molécula completa, se transporta a la superficie de la membrana para ligarse al peptidoglicano a través de un transportador ABC (Rajagopal & Walker, 2017).

Por otra parte, los ácidos lipoteicoicos (Fig. 6) poseen otras rutas biosintéticas. La estructura más común de estos ácidos consiste en cadenas de poliglicerol-fosfato unidas a un glicolípido situado en la membrana bacteriana. Este glicolípido suele ser diglicosil-diacilglicerol en *S. aureus* (Xia et al., 2010).

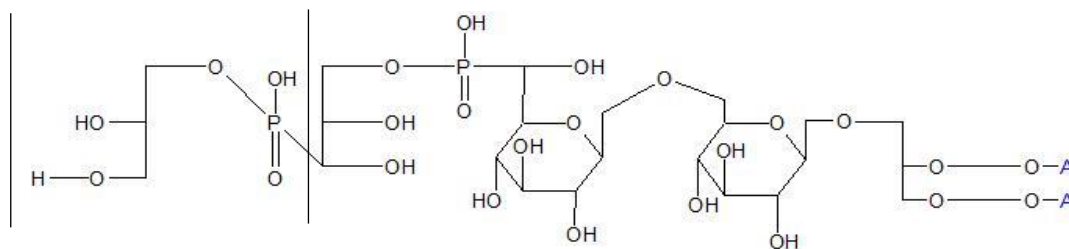


Figura 6. Estructura química básica de los ácidos lipoteicoicos. Imagen de elaboración propia basada en (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014)

Su síntesis comienza en el citoplasma, donde la enzima YpfP une dos glucosas al diacilglicerol para formar el glicolípido, y, posteriormente, la enzima LtaA lo transporta a través de la membrana (Rajagopal & Walker, 2017). A continuación, la enzima LtaS transfiere el glicerol-fosfato de moléculas de fosfatidilglicerol al glicolípido anteriormente sintetizado para formar el ALT (Gründling & Schneewind, 2007).

Finalmente, tanto los ácidos teicoicos de pared como los ácidos lipoteicoicos sufren una modificación con restos de alaninas, proceso conocido como D-alanización, que aporta una carga positiva y neutraliza las cargas negativas de los grupos fosfato situados en la cadena polimérica (Rajagopal & Walker, 2017). Además, los grupos de ribitol-fosfato presentes en los ácidos teicoicos de *S. aureus* sufren glicosilación en posición C4.

En el género *Staphylococcus* se ha demostrado que los procesos de D-alanización y glicosilación compiten por la misma posición en los ácidos lipoteicoicos; además, el 70% de los grupos glicerol-fosfato contienen D-alanina, y el 15% sufre glicosilación (Schneewind & Missiakas, 2014).

INTRODUCCIÓN

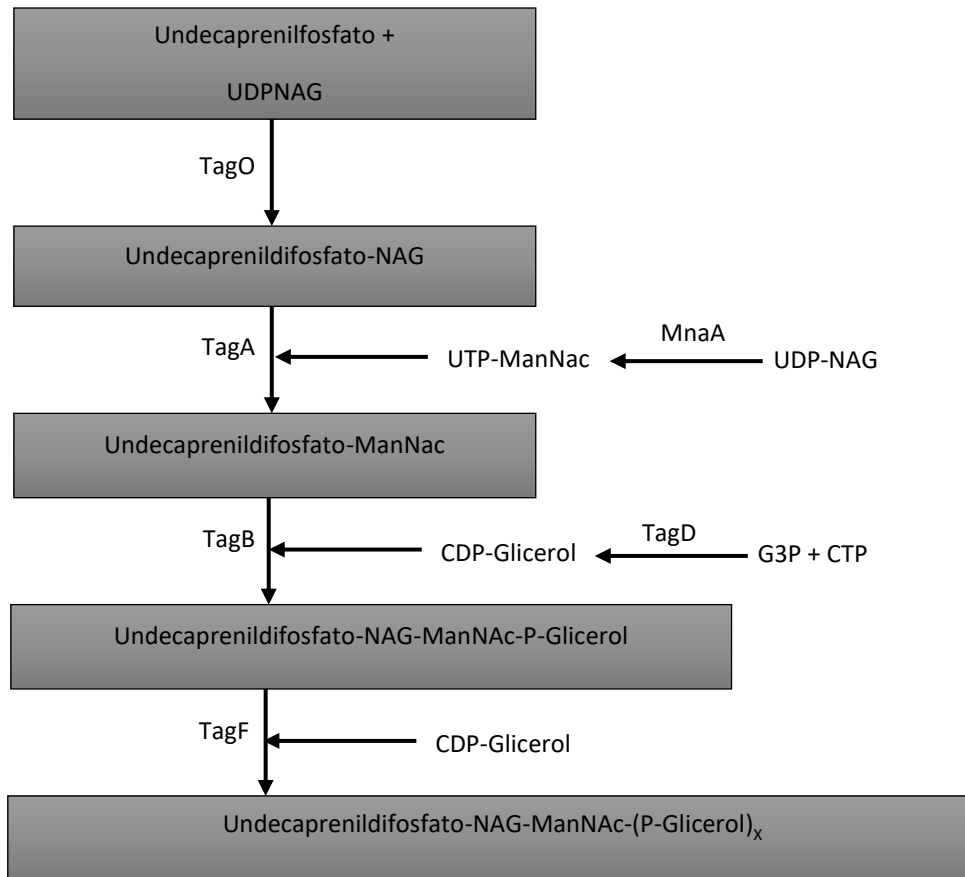


Figura 7. Esquema de la biosíntesis de los ácidos teicoicos. Abreviaturas: UDPNAG: Uridinadifosfato N-acetilglucosamina; Undecaprenilfosfato-NAG: Undecaprenilfosfato-N-acetilglucosamina; UTP-Man-Nac: Uridinatrifosfato-Manosamina; Undecaprenilfosfato-ManNac: undecaprenilfosfato-manosamina; G3P: Gliceroltrifosfato; CTP: citidinatrifosfato; CDP-Glicerol: citidinadifosfato-Glicerol; Undecaprenildifosfato-NAG-ManNac-P-Glicerol: Undecaprenildifosfato-N-acetilglucosamina-manosamina-glicerolfosfato (Singh, Chang, Coffman, & Kim, 2017)

4.3 Proteínas de pared

Uno de los factores más importantes en la interacción entre *Staphylococcus* y el hospedador son las proteínas de pared, consideradas como uno de los factores de virulencia de *S. aureus* (Clarke & Foster, 2006; Foster, Geoghegan, Ganesh, & Höök, 2014).

S. aureus es capaz de expresar 24 proteínas de pared diferentes, sin embargo, los estafilococos coagulasa-negativos expresan un menor número. Además, la expresión de estas proteínas varía según las condiciones de cultivo o la fase de crecimiento en la

INTRODUCCIÓN

que se encuentre el microorganismo, y su secreción depende de una secuencia señal común (Foster, 2017). Estas secuencias dirigen a las proteínas al sistema secretor de la bacteria para que sean ancladas al peptidoglicano debido a la acción de sortasas (Speziale, Pietrocola, Foster, & Geoghegan, 2014).

Se ha propuesto que estas proteínas se pueden clasificar en cuatro grupos, dependiendo de la presencia de motivos definidos por análisis de estructura-función (Foster et al., 2014).

En primer lugar, encontramos la familia de proteínas MSCRAMM, “Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules”. Estas proteínas son capaces de unirse a regiones estructuralmente similares a la estructura de la inmunoglobulina G (IgG). En este grupo encontramos las proteínas SdrG, ClfA, ClfB y la proteína A (Speziale et al., 2014). Hay que destacar la importancia de la proteína A en *S. aureus*, ya que una de las técnicas de tipado molecular de esta especie, “spa-typing”, se basa en la secuenciación de una región polimórfica que codifica esta proteína (Foster et al., 2014).

Otra familia de estas proteínas importante es la G5-E. Las proteínas pertenecientes a esta familia poseen cinco glicinas conservadas en una triple hélice beta (Foster, 2017). En ella encontramos a las proteínas SasG, presente en *S. aureus* y Aap, proteína necesaria para la formación de biofilms en *S. epidermidis* (Foster et al., 2014).

También están incluidas las proteínas de unión a fibronectina, FnbpA y FnbpB “Fibronectin-Binding Protein”, aunque FnbpA posee, además, la capacidad de unirse a fibrinógeno, y ambas son capaces de unirse a elastina (Clarke & Foster, 2006).

Una de las familias más importantes recibe el nombre de familia NEAT “Near Iron Transporter”. Estas proteínas están implicadas en la captura del grupo hemo de la hemoglobina y ayudan a la supervivencia de la bacteria dentro del hospedador (Foster et al., 2014). En este grupo encontramos las proteínas IsdA, IsdB, IsdC e IsdH. IsdA es la proteína más estudiada de este grupo y es capaz de unirse a la transferrina, pero no es capaz de atrapar el hierro por sí misma. Sin embargo, la proteína IsdH se une a la

INTRODUCCIÓN

proteína haptoglobina, proteína capaz de secuestrar la hemoglobina libre del suero sanguíneo (Clarke & Foster, 2006).

También se conocen otras proteínas en la superficie de *Staphylococcus* importantes para la formación de biofilms y la infección del hospedador, pero no se pueden enmarcar dentro de ningún grupo, ya que su mecanismo de acción no es tan conocido (Speziale et al., 2014). Un ejemplo es la proteína Bap, presente en *S. aureus*, encargada de promover la adhesión temprana y la adhesión intercelular del microorganismo para la formación del biofilm bacteriano (Arrizubieta, Toledo-Arana, Amorena, Penadés, & Lasa, 2004).

Una de las proteínas más importantes es Ebh “Extracelular matrix-binding protein”, codificada por uno de los genes más largos de *S. aureus*. En algunas cepas se expresan dos proteínas: EbhA y EbhB. Se ha propuesto que esta proteína puede estar implicada en la adhesión bacteriana a las células endoteliales por su capacidad de unión a fibronectina (Clarke & Foster, 2006).

También hay que destacar la proteína Cna, “Collagen adhesin”, que es capaz de unirse al colágeno usando el mecanismo conocido como “collagen hug” (Foster et al., 2014), Las proteínas Pls, “Plasmin-sensitive cell wall protein”, son capaces de inmovilizar tanto la fibronectina como la inmunoglobulina IgG; además, actúan como factor de virulencia en los casos de artritis causada por SARM. La proteína emp, “extracelular matrix protein-binding protein”, muestra especificidad por las proteínas del plasma, lo que se ha asociado con el reclutamiento de factores, como complementos de activación, implicados en homeostasis y remodelación tisular (Clarke & Foster, 2006).

4.4 Membrana celular

La membrana celular está formada por una bicapa lipídica y distintos tipos de proteínas, variables entre las distintas especies. Los componentes principales son los fosfolípidos, cuya función es formar una barrera semipermeable que permita la acumulación intracelular de moléculas relevantes para el desarrollo y crecimiento bacteriano, así como proteger a la bacteria de sustancias perjudiciales. Intervienen en

INTRODUCCIÓN

algunos procesos metabólicos esenciales, como la generación de ATP o la funcionalidad de algunas proteínas integrales de membrana (Rajagopal & Walker, 2017).

Además, los fosfolípidos juegan un papel fundamental en la patogenia del proceso infeccioso, ya que actúan de barrera protectora y son objetivo de antibióticos y del sistema inmune (Kuhn, Slavetinsky, & Peschel, 2015).

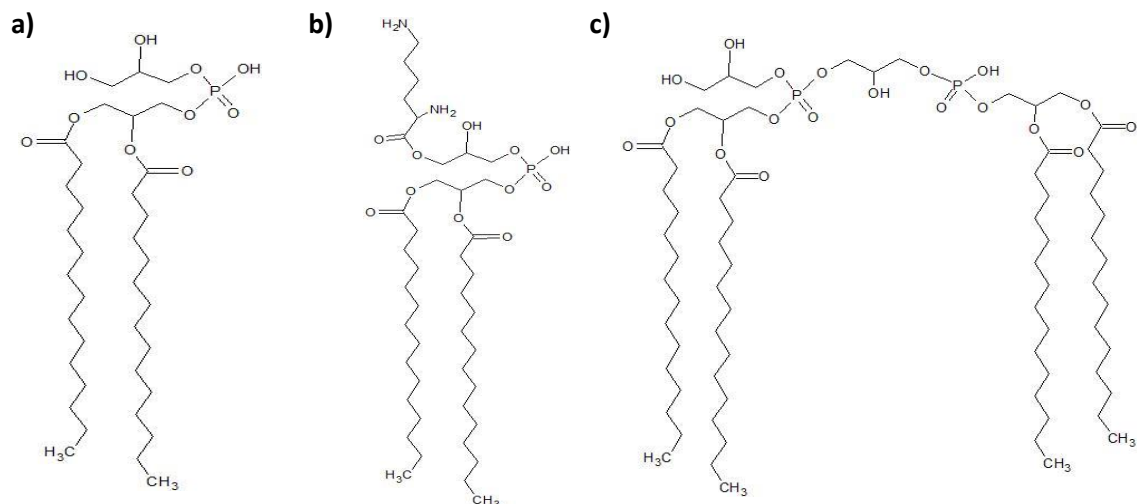


Figura 8. Estructura química de los componentes principales de la envoltura celular bacteriana a) PG, b) LPG y c) DPG. Figuras de elaboración propia con el programa ChemSketch basado en (Slavetinsky, Kuhn, & Peschel, 2017).

Entre los fosfolípidos más abundantes de la membrana de *Staphylococcus* se encuentran fosfatidilglicerol (PG) (Fig. 8a), difosfatidilglicerol (DPG) (Fig. 8c), también conocido como cardiolipina, y lisil-fosfatidilglicerol (LPG) (Fig. 8b) (Ernst & Peschel, 2011), además de glicolípidos como diglicosildiacylglicerol (GL) (Fig. 9a), diacylglicerol (DAG) (Fig. 9b) y, probablemente, cierta cantidad de ácidos grasos libres (AGL) (Fig. 10). Debido a la gran cantidad de PG y DPG la carga neta de la membrana es negativa.

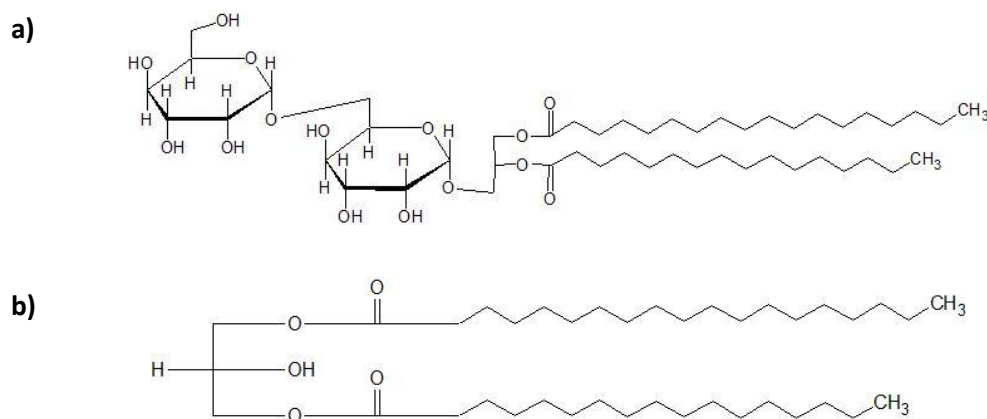


Figura 9. Estructura química de: a) Diglicosildiácilglicerol (GL). Imagen propia obtenida con el programa ChemSketch basada en (Hauksson, Rilfors, Lindblom, & Arvidson, 1995) y b) Diácilglicerol (DAG). Imagen de elaboración propia obtenida con el programa ChemSketch basada en (Eichmann & Lass, 2015).

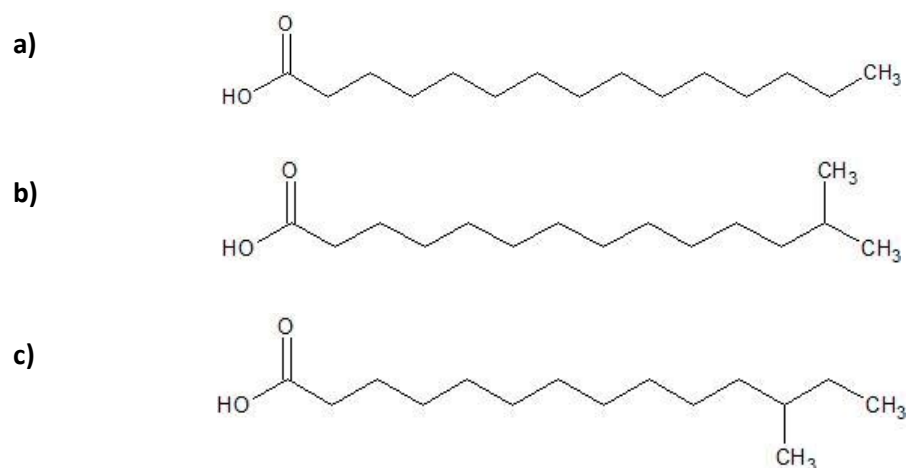


Figura 10. Estructura química del ácido graso pentadecanoico (C15): a) lineal, b) iso-ramificado, c) anteiso-ramificado. Imágenes de elaboración propia obtenidas con el programa ChemSketch basadas en (Cronan & Thomas, 2009).

La ruta de biosíntesis de fosfolípidos aparece esquematizada (productos y genes) en la Fig. 11. Todos los lípidos derivan de ácido fosfatídico (AF), que es transformado a PG tras la acción secuencial de CdsA, PgsA y PgpP, esta última aún está por localizar en el genoma de *Staphylococcus* (Kuhn et al., 2015).

A partir de PG, y por acción de Cls1/Cls2 se forma DPG: en estafilococos la enzima principal en la síntesis de DPG es Cls2, aunque se ha observado que Cls1 se expresa bajo condiciones de estrés, como alta salinidad o bajo pH (Ohniwa, Kitabayashi, & Morikawa, 2013).

LPG se forma por adición de una lisina a PG, reacción en la que interviene MprF ‘Multiple peptide resistance factor’, enzima que, a su vez, es una flipasa (Ernst et al., 2009).

PG aporta el glicerol-fosfato que constituye la unidad repetitiva de la estructura del LTA en *Staphylococcus*, sintetizándose el glicolípido de unión a la membrana de este

INTRODUCCIÓN

compuesto a partir de DAG y glucosa, en una reacción en la que interviene YpfP, una glicosiltransferasa reiterativa (Kuhn et al., 2015).

El exceso de DAG de esta reacción se fosforila por la enzima DgkB, incorporándose al proceso de síntesis de estos lípidos en forma de ácido fosfatídico (Fig. 11).

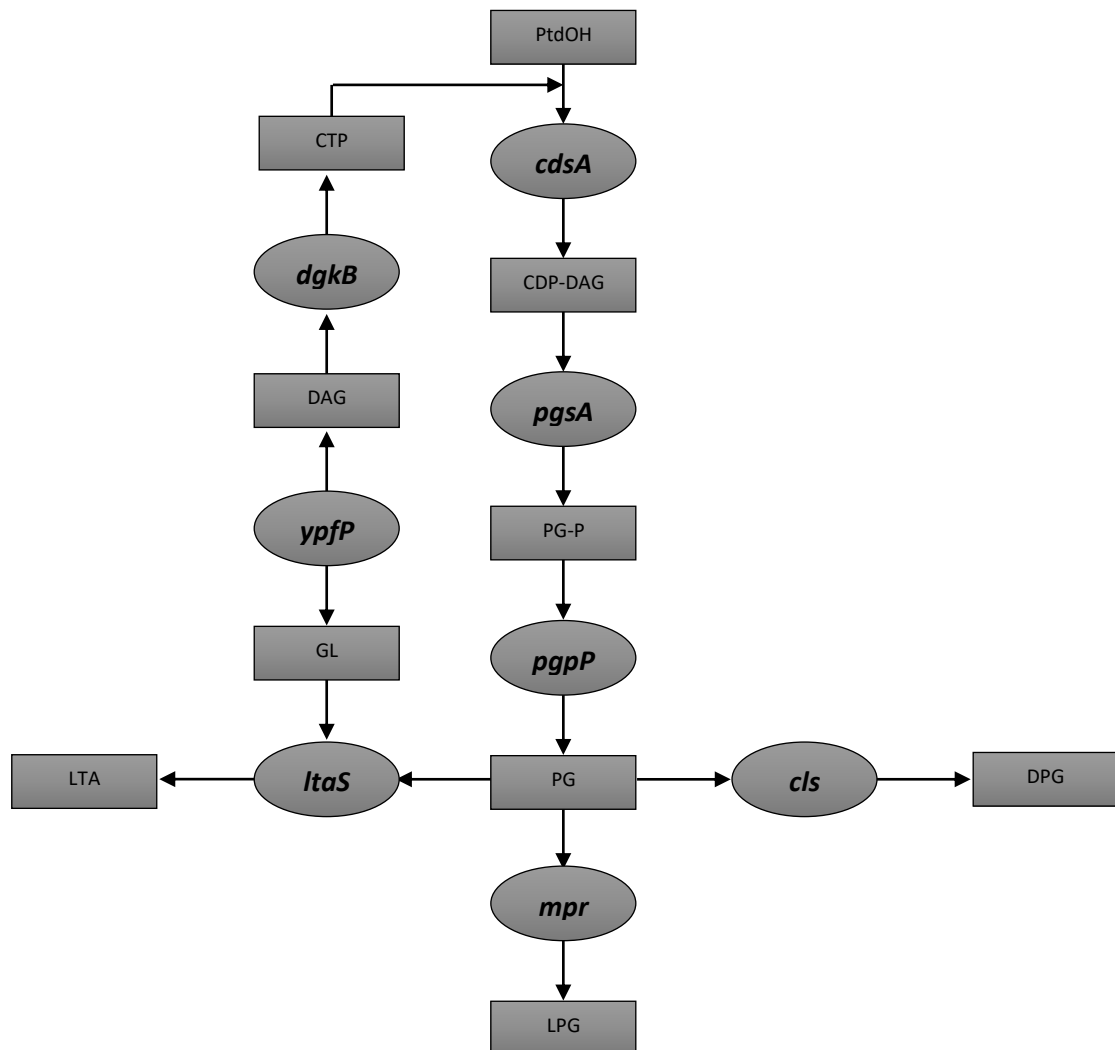


Figura 11. Ruta de síntesis de los componentes de la envoltura celular bacteriana. Abreviaturas: PtdOH: Ácido fosfatídico; CDP-DAG: citidindifosfato-diacilglicerol; PG-P: fosfatidilglicerol-fosfato; PG: fosfatidilglicerol; DPG: difosfatidilglicerol; LPG: lisil-fosfatidilglicerol; LTA: ácidos lipoteicoicos; GL: glicolípido; DAG: diacilglicerol; CTP: citidintrifosfato. Basado en (Kuhn et al., 2015)

Los ácidos grasos que componen los fosfolípidos determinan la fluidez de la membrana, así como diversas funciones asociadas a esta, como la permeabilidad a moléculas hidrofóbicas, transporte activo de solutos o interacciones proteína – proteína

INTRODUCCIÓN

(Zhang & Rock, 2008). La composición de ácidos grasos (grupos acilo) de los lípidos de membrana puede variar según las condiciones de cultivo y la fase de crecimiento en la que se encuentren los microorganismos. De manera general, en *Staphylococcus* se ha observado que la longitud de cadena varía entre 14 y 21 carbonos, además, las cadenas impares, mayoritarias sobre las pares, presentan iso y anteiso-ramificaciones (Fig. 10), predominando el ácido anteiso-C15 (White & Frerman, 1968). Estos ácidos grasos son muy comunes en bacterias Gram-positivas y en Gram-negativas, y derivan de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Tras ser desaminados y descarboxilados se incorporan como acil-CoA a la ruta de biosíntesis del complejo FAS II, que elonga la cadena introduciendo dos carbonos por ciclo (Fig. 12) (Kaneda, 1991). FAS II libera a la “Acyl carrier protein” (ACP), capaz de unirse a los ácidos grasos y transportarlos de enzima a enzima en este proceso (Beld, Lee, & Burkart, 2015).

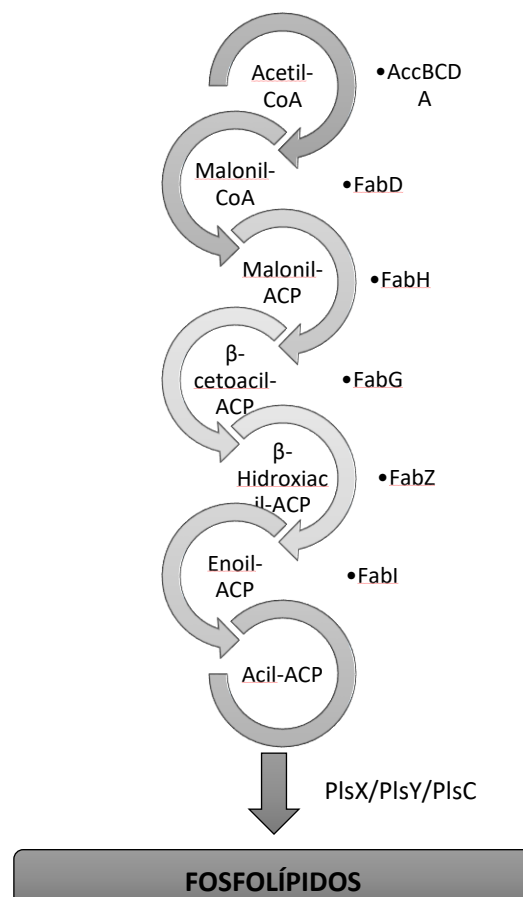


Figura 12. Esquema de la biosíntesis de ácidos grasos. Abreviaturas: CoA: coenzima A; ACP: proteína transportadora de acilos. Basado en (Freiberg et al., 2004; Morvan et al., 2017).

INTRODUCCIÓN

La proteína FabH introduce el ácido graso al ciclo de elongación. A continuación las enzimas FabG, FabA, FabI y FabB completan el ciclo con varias reacciones de condensación, reducción y deshidratación para alargar la cadena de carbonos (Payne, Warren, Holmes, Ji, & Lonsdale, 2001).

La enzima PlsX, una acil-ACP transacilasa periférica de membrana, activa los acil-fosfatos sintetizados de novo para que la enzima integral de membrana PlsY los introduzca en la posición *sn*-1 del glicerol-3-fosfato (G3P). La proteína PlsC los incluye en la posición *sn*-2 (Kuhn et al., 2015; Parsons, Frank, Jackson, Subramanian, & Rock, 2014). Además, *Staphylococcus* es capaz de introducir en sus fosfolípidos ácidos grasos procedentes del medio de cultivo, gracias a una acil-CoA sintasa, que desvía estos ácidos grasos a la ruta de PlsX/PlsY/PlsC para su incorporación a los fosfolípidos (Yao & Rock, 2017).

La biosíntesis e incorporación de los ácidos grasos a los fosfolípidos está controlada por FapR y FabT, reguladores transcripcionales implicados en la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de fosfolípidos (Albanesi & de Mendoza, 2016).

La organización de los lípidos que componen la membrana es esencial para la integridad bacteriana. Se ha demostrado que las bacterias son capaces de compartimentalizar sus procesos celulares gracias a la existencia de microdominios funcionales de membrana (MFM) (López & Koch, 2017). La formación de estos microdominios se ha relacionado con la síntesis y agregación de compuestos isoprenoides, estafiloxantina en caso de *Staphylococcus aureus*, y una enzima homóloga a la flotilina de eucariotas (Pelz et al., 2005). Se ha propuesto que esta enzima se encarga de reclutar proteínas a los microdominios para facilitar la interacción y oligomerización proteica (García-Fernández et al., 2017).

5. Evolución de la resistencia a antibióticos en el género *Staphylococcus spp.*

Los primeros antibióticos se originan a partir de productos secretados por microorganismos como defensa natural contra otros patógenos. Quizás, por esta razón, cuando se introducen en la práctica clínica y se empiezan a utilizar en el tratamiento frente a infecciones ya había cepas resistentes.

Más tarde, se desarrollaron nuevos antibióticos semisintéticos por modificación química de la estructura de algunos de los antimicrobianos originales. Estos cambios se produjeron en la zona de unión del antimicrobiano con su diana, o en el centro activo de la molécula (Foster, 2017). Además, también se sintetizaron *de novo* moléculas, basándose estructuralmente en otras moléculas con capacidad antimicrobiana presentes tanto en procariotas como eucariotas.

Durante un tiempo estas nuevas moléculas fueron eficaces, pero debido, fundamentalmente, a su uso indiscriminado han aparecido cepas patógenas que han desarrollado resistencia a muchos de ellos. Un ejemplo es el clon de *S. capitis* NRCS-A, aislado en las unidades de cuidados intensivos neonatales, que presenta una sensibilidad disminuida a todos los antibióticos usados habitualmente para su tratamiento (Butin et al., 2016).

Pero quizás, el ejemplo más típico del denominado “capitalismo genético”, a la hora de adquirir resistencia a antibióticos se encuentra en *S. aureus*. Este microorganismo tiene una gran capacidad para adquirir resistencia a antibióticos de diferentes familias utilizados en su tratamiento (Fig. 13).

En la actualidad más del 60% de las infecciones que se detectan en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs) en Estados Unidos son producidas por SARM (Hiramatsu et al., 1997; Kumar, 2016; Lee et al., 2017).

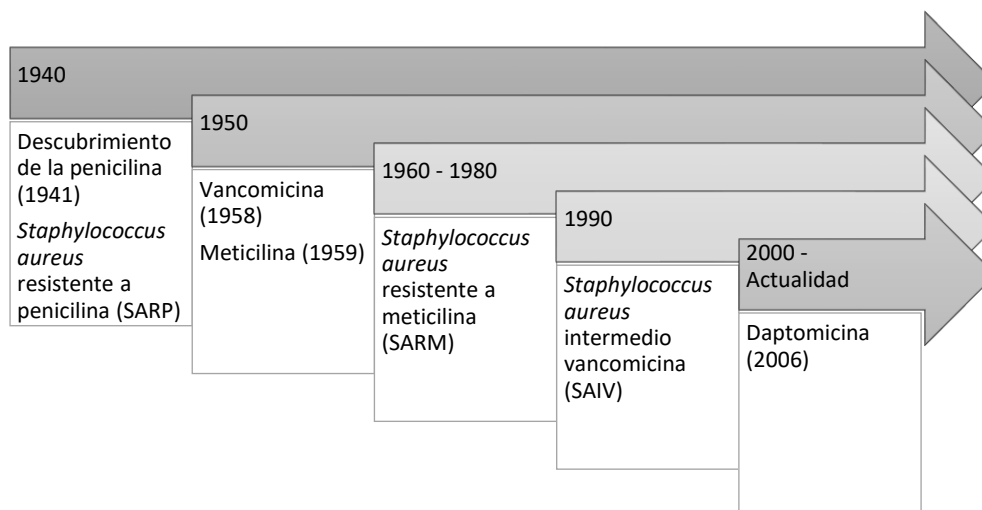


Figura 13. Evolución de la resistencia a distintos antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Basado en (McGuinness, Malachowa, & DeLeo, 2017).

5.1 Resistencia a β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos fueron descubiertos por Alexander Fleming en 1928. La presencia de un anillo β -lactámico, estructuralmente similar al dipéptido D-Ala-D-ala del peptidoglicano, define químicamente a esta familia de antibióticos y es el que permite la unión al centro catalítico de las enzimas PBPs “Penicillin Binding Protein”, situadas en la membrana bacteriana y responsables de la transpeptidación del peptidoglicano durante la síntesis de la pared celular, interfiriendo así en la construcción de los puentes cruzados entre las cadenas de peptidoglicano (Guignard, Entenza, & Moreillon, 2005). El resultado final es la inhibición del crecimiento bacteriano por interferencia en la síntesis de la pared bacteriana.

La unión del anillo β -lactámico a una cadena lateral modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de β -lactamasas (Fig. 14).

En el género *Staphylococcus* se han descrito dos mecanismos de resistencia a β -lactámicos. El primero se debe a la producción de la enzima β -lactamasa, codificada por el gen *blaZ*. Esta enzima inhibe la acción de la penicilina hidrolizando el anillo β -

INTRODUCCIÓN

lactámico de su estructura, y tiene efecto sobre las penicilinas naturales y las semisintéticas, siendo inactiva frente al resto de β -lactámicos (McGuinness et al., 2017).

El segundo mecanismo es por producción de una PBP adicional, PBP2a, codificada por el gen *mecA*, adquirido en *S. aureus* por un ADN exógeno denominado SCCmec, “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*” (Lakhundi & Zhang, 2018).

La meticilina, un β -lactámico semisintético, se introdujo en 1959 para tratar infecciones de *S. aureus* resistentes a penicilinas. Tras dos años de uso clínico, aparecieron las primeras cepas resistentes (SARM) cuyo mecanismo de resistencia, citado anteriormente, consistía en la síntesis de una PBP adicional (McGuinness et al., 2017).

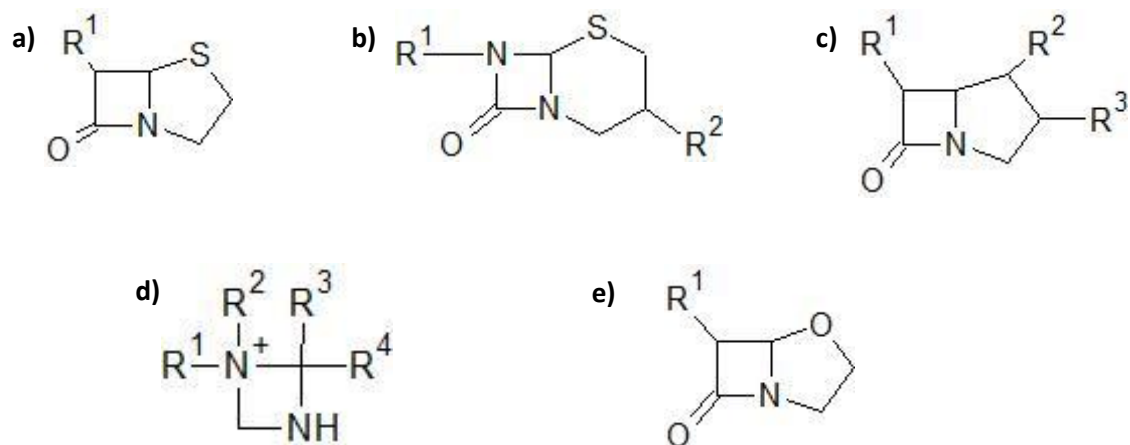


Figura 14. Estructura química de: a) penicilina, b) cefalosporinas, c) carbapenems, d) monobactámicos y e) ácido clavulánico. Imágenes de elaboración propia realizada con el programa ChemSketch basada en (Suárez & Gudiol, 2009; Vincent & Amar, 2002).

El centro catalítico de esta enzima se encuentra distorsionado, por lo que los β -lactámicos no tienen suficiente afinidad por esta estructura, y en presencia de estos antimicrobianos, PBP2a es capaz de mantener la biosíntesis de la pared activa. También se han descrito aislados clínicos que presentaban resistencia a oxacilina, pero no poseían el gen *mecA*. La resistencia de estos aislados se debía a modificaciones en el dominio transpeptidasa de la enzima PBP2 (McCallum, Berger-Bächli, & Senn, 2010). Se ha observado otro mecanismo alternativo de resistencia a oxacilina, mediante el cual las

cepas presentan una sensibilidad intermedia al antibiótico, “Borderline Oxacillin Resistant *S. aureus*” (BORSA).

5.2 Resistencia a glucopeptidos

Los glucopeptidos (Fig. 15) son antibióticos producidos por actinomicetos que poseen un núcleo de heptapeptidos tricíclicos o tetracíclicos, glicosilado y, en ocasiones, presentan un ácido graso unido a su estructura. A esta familia pertenecen los antibióticos vancomicina y teicoplanina, entre otros (Yim, Thaker, Koteva, & Wright, 2014).

Este grupo de antimicrobianos afecta la síntesis de la pared celular bacteriana, ya que es capaz de unirse al dipéptido D-Ala⁴-D-Ala⁵ del lípido II, impidiendo la transglicosilación y transpeptidación del peptidoglicano. También se han descrito otros mecanismos de acción secundarios, como la inhibición de la síntesis de ARN y la alteración de la permeabilidad de la pared, en algunos miembros de este grupo (Foster, 2017).

La vancomicina es el antibiótico más relevante de esta familia. Fue descubierto en 1950, pero su uso clínico no se produjo hasta finales de los años 80, tras la creciente aparición de cepas resistentes a metilina. En ese momento la vancomicina pasó a ser el antibiótico de elección frente a infecciones producidas por bacterias Gram positivas, sobre todo SARM y *Clostridium difficile* (Butler, Hansford, Blaskovich, Halai, & Cooper, 2014).

INTRODUCCIÓN

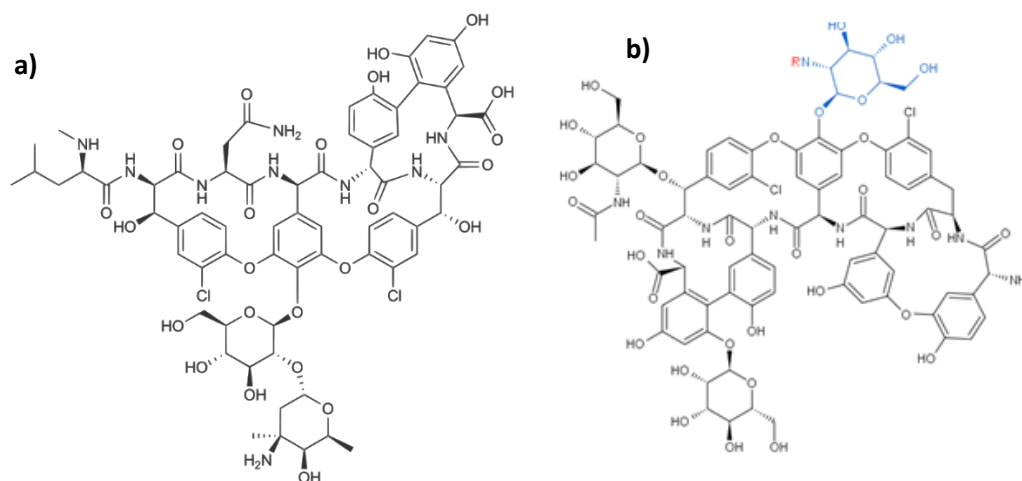


Figura 15. Estructura química de: a) vancomicina y b) teicoplanina, dos antibióticos glucopéptidos. Fuente Wikipedia.

A los pocos años de su introducción en la clínica aparecieron aislados de *S. aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (SAIV), con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de entre 4 y 16 mg/L, y cepas resistentes a vancomicina (SARV), con CMI mayor de 16 mg/L (Vestergaard, Frees, & Ingmer, 2019).

La resistencia a vancomicina se debe al operón *van*, procedente de un plásmido de enterococos que adquiere *S. aureus* por eventos puntuales de conjugación. Este operón contiene genes inducibles por la presencia de vancomicina que modifican el dipéptido D-Ala-D-Ala del lípido II por D-Ala-D-Lactato; el antibiótico muestra una menor afinidad por este nuevo compuesto, por lo que no inhibe la síntesis de la pared bacteriana (Foster, 2017).

Entre 2002 y 2012 solo se encontraron, en Estados Unidos, 13 cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina que poseían el operón *van*, por lo que este mecanismo de resistencia no parece que se haya extendido entre aislados de esta bacteria (Butler et al., 2014).

Por otra parte, el fenotipo de sensibilidad reducido que han mostrado algunas aislados se ha relacionado con infecciones persistentes tratadas durante un largo periodo con vancomicina. El mecanismo responsable de esta disminución de la sensibilidad no es del todo conocido, pero se ha visto que puede desencadenarse por el tratamiento con otros antibióticos como los β -lactámicos (McGuinness et al., 2017).

INTRODUCCIÓN

Estas cepas presentan un mayor grosor de la pared bacteriana y un peor entrecruzamiento del peptidoglicano, lo que impide que este tipo de antibióticos actúen. Este fenotipo se ha relacionado con una acumulación de mutaciones genéticas, especialmente en los genes reguladores (McCallum et al., 2010). Otras alteraciones, como una disminución de la carga negativa en la envoltura celular, menor autólisis o aumento de la síntesis de la pared celular, también se han relacionado con la sensibilidad disminuida a vancomicina (Vestergaard et al., 2019).

Los mecanismos por los que se desarrolla este fenotipo no son del todo conocidos, pero se han asociado un gran número de mutaciones en diferentes genes (Tabla 1).

Tabla 1. Genes asociados al fenotipo de sensibilidad reducida a vancomicina

Fenotipo	Genes asociados a SAIV
<i>Mayor grosor de la pared y menor autólisis</i>	<i>graSR</i>
	<i>walKR</i>
	<i>yycH</i>
	<i>pbp4</i>
	<i>sarA</i>
	<i>mgrA</i>
	<i>clpP</i>
	<i>stp1</i>
<i>Aumento de la síntesis de la pared celular</i>	<i>vraSR</i>
	<i>vraFG</i>
	<i>mprF</i>
	<i>spoVG</i>
	<i>capA-capP</i>
	<i>prsA</i>
<i>Desregulación global</i>	<i>agr</i>
	<i>rot</i>
	<i>rpoB</i>
	<i>rsbU</i>
	<i>yjbH</i>

<i>Disminución de la producción de factores de virulencia</i>	<i>yvqF</i>
	<i>spa</i>
	<i>sbl</i>
<i>Función desconocida</i>	<i>trfA/tfB</i>

De entre estos genes, cabe destacar la relevancia de las mutaciones en *graRS* y *walkR*, relacionados con la resistencia a glucopéptidos. El gen *rpoB*, relacionado con la ARN polimerasa, también juega un papel crucial en la aparición de esta falta de sensibilidad a vancomicina (McGuinness et al., 2017).

La creciente aparición de aislados con sensibilidad disminuida a vancomicina supone un problema muy importante para el tratamiento de estas infecciones.

5.3 Resistencia a lipoglucopeptidos

La aparición de aislados resistentes o con sensibilidad reducida a vancomicina, llevó a la necesidad de buscar alternativas de tratamiento. De este modo se desarrollaron los lipoglucopeptidos como telavancina, oritavancina y dalbavancina (Fig. 16). Son derivados de vancomicina a los que se les ha añadido una cadena lipofílica, pero el núcleo heptapeptídico se mantiene.

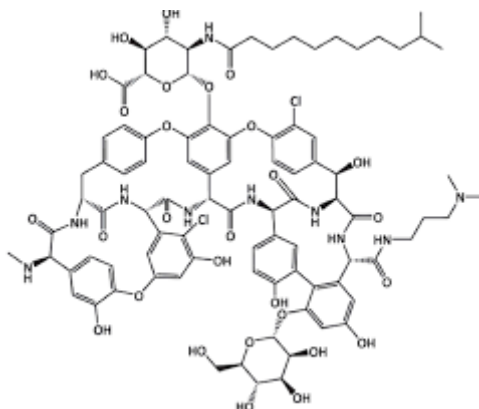


Figura 16. Estructura química de dalbavancina. Fuente Wikipedia.

El mecanismo de acción que presentan es multifactorial y depende de cada uno. Dalbavancina inhibe la síntesis de peptidoglicano; sin embargo, otros, como telavancina, interaccionan con la membrana plasmática de la bacteria provocando su disrupción, y, finalmente, la lisis bacteriana (Vestergaard et al., 2019)

La resistencia a este grupo de antimicrobianos es muy poco común, debido a la prolongada acción *in vivo*. Aunque este hecho también puede contribuir a la selección de población resistente a estos antibióticos a concentraciones sub-inhedorias. El desarrollo de esta resistencia se ha asociado con mutaciones en los genes implicados en la regulación del metabolismo de la pared celular bacteriana, implicados también en la resistencia a vancomicina (Werth et al., 2018; Yoo et al., 2013).

5.4 Resistencia a linezolid

Linezolid (Fig. 17) es una oxazolidinona de síntesis química aprobada en el año 2000 por la FDA para el tratamiento de infecciones nosocomiales provocadas por SARM de difícil tratamiento. Este antibiótico interactúa con el ARNr 23S bloqueando la síntesis de proteínas e impidiendo el acople del ARNt en el centro peptidiltransferasa. Además, interactúa con el ARNt, la proteína ribosomal L27, y la proteína LepA (Foster, 2017; Vestergaard et al., 2019).

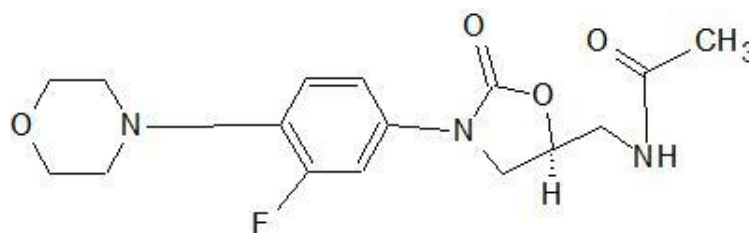


Figura 17. Estructura química de linezolid. Imagen de elaboración propia con el programa ChemSketch basada en (Douros, Grabowski, & Stahlmann, 2015).

La aparición de resistencia a este antibiótico supone un grave problema, especialmente en el tratamiento de infecciones complejas por SARM. Se ha relacionado con numerosas mutaciones en el ARNr que alteran el lugar de interacción del antimicrobiano con la proteínas ribosomales 50S, L3, L4 o L22, y con la adquisición por transferencia lateral del gen *cfr*, que codifica una metiltransferasa que modifica el ARNr 23S, o el gen *optrA*, que codifica un transportador ABC (Belousoff et al., 2017; Lazaris et al., 2017). La adquisición de estos genes no es frecuente, pero la mayoría infecciones clínicas por SARM resistente a linezolid se han asociado a su presencia (Sierra et al., 2013).

6. Daptomicina

La daptomicina es un antibiótico de naturaleza lipopeptídica producido por *Streptomyces roseosporus* (Heidary et al., 2017), que presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas. Fue aprobado en 2003 por la FDA para tratar infecciones de tejidos blandos, y en 2006 para el tratamiento de bacteriemias producidas por *S. aureus* (Baltz, 2009).

En la actualidad, daptomicina se ha convertido en un recurso imprescindible para tratar infecciones complicadas causadas por SARM o *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (ERV) (Miller et al., 2016). Se ha demostrado que daptomicina es entre 4 y 8 veces más activa que la vancomicina y unos 30 veces más activa que linezolid contra SARM y SASM (Gómez Casanova et al., 2017).

Estructuralmente (Fig. 18), daptomicina es un lipopéptido cíclico formado por un depsipéptido de 13 aminoácidos, de los cuales, diez forman un núcleo cíclico que contiene aminoácidos no canónicos, como kineurina, ornitina y ácido 3-metilglutámico, además de D-enantiómeros. Al triptófano terminal de los otros tres aminoácidos se une un ácido graso (Miller et al., 2016), crucial para la actividad antimicrobiana de la daptomicina (Hernández et al., 2007).

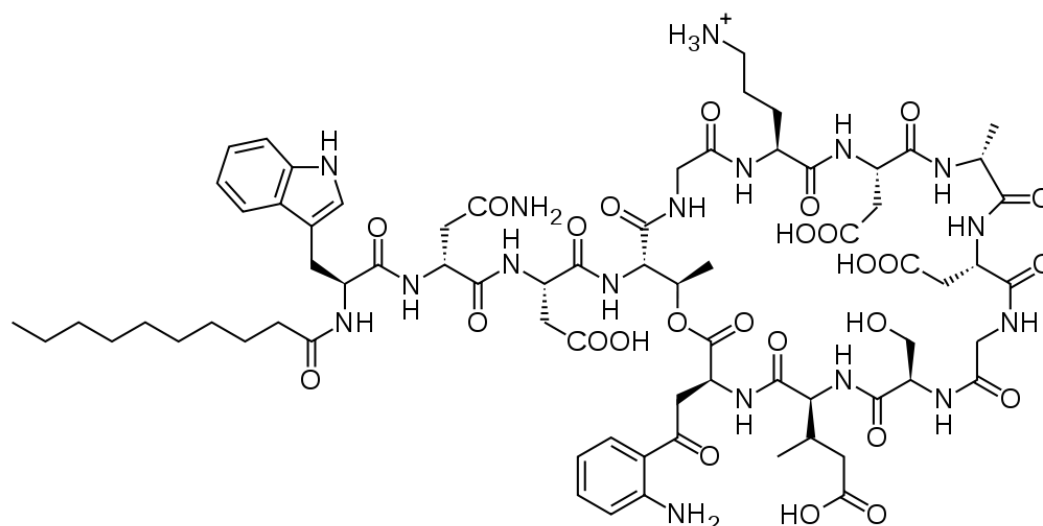


Figura 18. Estructura química de daptomicina (Casanova, Ruiz & Bellido. 2017).

6.1 Mecanismo de acción

La estructura de la daptomicina es muy similar a la de otras moléculas producidas por el sistema inmunitario de mamíferos, conocidas como péptidos catiónicos antimicrobianos (PCAs), y, más concretamente, a la de la catelicidina LL-37 humana. Estas moléculas son capaces de actuar frente a bacterias, hongos y algunos virus envueltos, uniéndose a la membrana y provocando su rotura (Aisenbrey, Marquette, & Bechinger, 2019). La similitud estructural entre daptomicina y PCAs, ha llevado a postular que el mecanismo de acción de daptomicina también sea parecido al de estas moléculas, aunque este no se conoce con exactitud (Fig. 18) (Gómez Casanova et al., 2017; Miller et al., 2016).

La actividad bactericida de daptomicina depende de su interacción con iones calcio (Ca^{2+}), en una relación molar 1:1, formándose así un complejo DAP-Ca^{2+} . La carga positiva que aporta el calcio a este complejo le proporciona gran afinidad por la membrana plasmática bacteriana, cuya carga neta suele ser negativa en *Staphylococcus*, al presentar como componente mayoritario el fosfolípido aniónico PG (Kreutzberger, Pokorny, & Almeida, 2017).

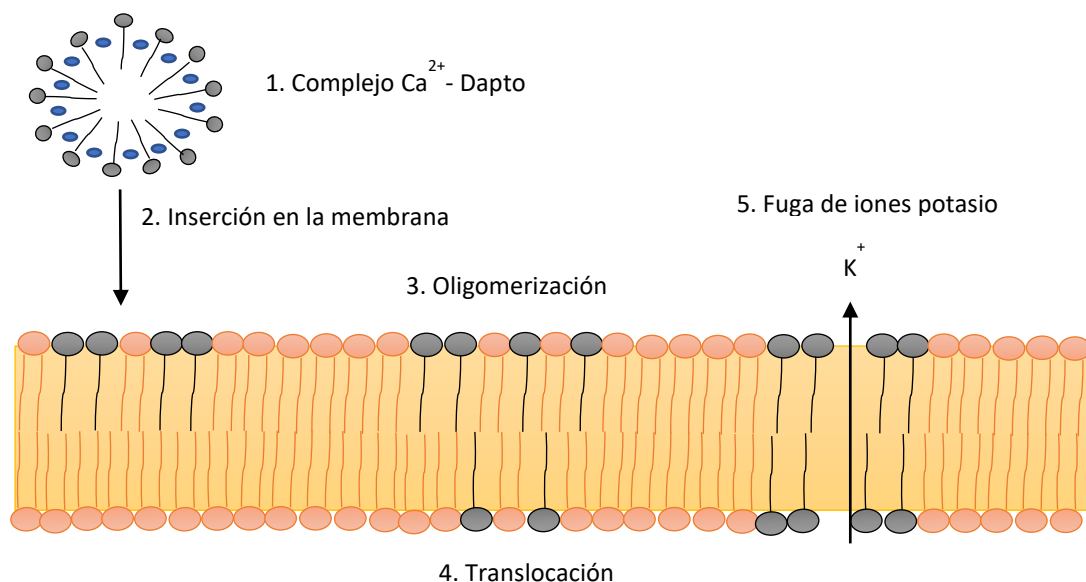


Figura 19. Mecanismo de acción de daptomicina sobre la membrana plasmática bacteriana. Imagen de elaboración propia basada en (Miller et al., 2016).

Para que se produzca la inserción y fijación de la daptomicina entre las moléculas de PG (Kreutzberger et al., 2017), es necesario que se produzca un cambio

INTRODUCCIÓN

conformacional en ésta (Fig.19). La presencia de PG provoca una oligomerización de las moléculas de daptomicina y su posterior translocación desde la cara externa de la membrana hacia la cara interna. Estos eventos dan lugar a la formación de un poro en la membrana bacteriana formado por dos oligómeros de cuatro unidades de daptomicina opuestos entre sí. A través de este poro se produce la pérdida de iones K^+ , lo cual provoca una disrupción del potencial de membrana y, como consecuencia, la despolarización de esta (Heidary et al., 2017), lo que ocasiona una interrupción de múltiples procesos vitales, que llevan a la muerte celular de la bacteria (Miller et al., 2016).

No obstante, todas las observaciones experimentales que llevaron a este modelo se realizaron a concentraciones muy elevadas de daptomicina, por lo que la situación *in vivo* podría ser diferente (Heidary et al., 2017). A concentraciones en torno a la CMI bacteriana se ha visto que daptomicina impide la regeneración celular desde el estado de protoplasto en *E. faecium*, como consecuencia de la inhibición de la síntesis de diversas macromoléculas, sobre todo los ácidos lipoteicoicos (Boaretti, Canepari, Lleò, & Satta, 1993).

Basándose en estudios con vesículas unilamelares, se ha propuesto otro mecanismo de acción para daptomicina. Se postula que la interacción con daptomicina altera de manera importante el contenido de fosfolípidos de la membrana celular, a través de lo que se ha llamado “efecto de extracción de lípidos”. En presencia de bajas concentraciones de daptomicina, la interacción de la vesícula con el antibiótico provocaría una expansión de esta; sin embargo, a concentraciones altas de daptomicina, tras esta expansión inicial, se produciría una disminución de la superficie de la vesícula, provocada por la expulsión de agregados formados por lípidos y péptidos (Chen, Sun, Sun, & Huang, 2014).

Utilizando *Bacillus subtilis* como modelo de estudio, se ha comprobado que la interacción de la daptomicina con la membrana celular se produce preferencialmente en los septos de división, e induce importantes cambios en la envoltura celular. A bajas concentraciones de daptomicina aparecen zonas irregulares y curvadas en las zonas de interacción que desencadenan una deslocalización de las proteínas de división celular e

induce la síntesis de peptidoglicano (Pogliano, Pogliano, & Silverman, 2012). De acuerdo con estas observaciones se ha propuesto que daptomicina se une a las moléculas de fosfatidilglicerol presentes en la membrana celular bacteriana, provocando alteraciones en su curvatura y haciendo que proteínas esenciales para la división celular, como DivIVA, no sean capaces de reconocer las zonas de división, inhibiendo la síntesis de peptidoglicano. A concentraciones altas de daptomicina, estos cambios en la homeostasis de la membrana celular producen una fuga de iones y una pérdida del potencial de membrana (Tran et al., 2015).

También se ha observado que daptomicina puede provocar la deslocalización de proteínas periféricas como MurG, involucrada en la síntesis del peptidoglicano, o PlsX, implicada en la síntesis de fosfolípidos (Müller et al., 2016).

Otros autores han propuesto que el mecanismo de acción de daptomicina puede estar relacionado con la inhibición de la síntesis del peptidoglicano o los ácidos lipoteicoicos en algunas especies bacterianas (Heidary et al., 2017), aunque este no parece ser el caso de *S. aureus* o *Enterococcus faecium* (Laganas, Alder, & Silverman, 2003).

6.2 Mecanismos de resistencia a daptomicina

Se considera que la resistencia a daptomicina es un evento raro en clínica, aunque cada vez se describen con más frecuencia cepas resistentes tras el tratamiento con el antibiótico (Miller et al., 2016). Los mecanismos habituales por los que se desarrolla resistencia a un antibiótico suelen estar relacionados con la modificación de la diana o la inactivación del antibiótico (Hernández Martí, 2007); sin embargo, el mecanismo exacto por el que se produce la resistencia a daptomicina no se ha determinado aún, pero de acuerdo con todos los estudios realizados en este campo se cree que es un mecanismo complejo y multifactorial relacionado con diversas mutaciones genéticas (Tabla 2) (Baltz, 2009; Bayer et al., 2015; Bayer, Mishra, Cheung, Rubio, & Yang, 2016; Bayer et al., 2014; Cui et al., 2010; Ernst & Peschel, 2019; Gómez Casanova et al., 2017; Miller et al., 2016). Dado que la daptomicina parece interactuar de manera directa con la membrana celular bacteriana, los cambios que se produzcan

INTRODUCCIÓN

en la composición de fosfolípidos y en su carga neta pueden llevar a un fenotipo de resistencia (Heidary et al., 2017).

Tabla 2. Genes asociados con la aparición de resistencia a daptomicina.

Gen	Función	Fenotipo asociado a la resistencia
<i>mprF</i>	Síntesis de LPG	Aumenta la carga positiva presente en la membrana
<i>cls2</i>	Síntesis de DPG	Aumento del grosor de la membrana celular bacteriana
<i>rpoB</i>	Subunidad β de ARN polimerasa	Aumento del grosor de la pared y disminución de la carga negativa
<i>rpoC</i>	Subunidad β' de ARN polimerasa	Aumento del grosor de la pared y disminución de la carga negativa
<i>clpP</i>	Degradación de proteínas	Menor expresión de <i>agr</i> y los factores de virulencia
<i>yycFG</i>	Control de la síntesis de peptidoglicano	Aumento del grosor de la pared
<i>pgsA</i>	Síntesis de PG	Disminución de PG en la membrana
<i>agr</i>	Sistema regulador mediante "quorum sensing"	Liberación de fosfolípidos al medio externo
<i>prs</i>	Fosforibosilprofosfato sintetasa	Desregulación de la síntesis de purinas
<i>pnpA</i>	Fosforilasa necesaria para la expresión de genes de virulencia	Problemas de transcripción
<i>dltABCD</i>	Alanización de los ácidos teicoicos	Aumenta la carga positiva presente en la envoltura celular
<i>vraSR</i>	Sistema regulador de la biosíntesis de la pared	Desregulación de biosíntesis de la pared
<i>graSR</i>	Regulador de la expresión de <i>mprF</i> y <i>dltABCD</i>	Menor carga neta negativa en la envoltura celular bacteriana

Uno de los genes más frecuentemente relacionado con la resistencia a daptomicina en el género *Staphylococcus* es *mprF* ("multiple peptide resistance Factor") (Ernst & Peschel, 2019). Este gen codifica una enzima bifuncional integral de membrana del mismo nombre, encargada de la síntesis de LPG, fosfolípido con carga positiva,

INTRODUCCIÓN

componente esencial de la membrana de estas bacterias. Concretamente, esta enzima cataliza la transferencia de una molécula de lisina, procedente de un lisil-ARNt, a una molécula de PG, y su posterior translocación a la parte externa de la membrana (Bæk et al., 2015; Bayer et al., 2014; Ernst & Peschel, 2011).

Estructuralmente (Fig. 20) se pueden distinguir dos partes muy bien definidas en MprF: a) un extremo C-terminal, hidrofílico, de entre 6 y 14 hélices transmembrana y con unos 300 aminoácidos en el citosol, responsable de la unión de la lisina a la molécula de PG, y b) un extremo N-terminal de carácter hidrofóbico, responsable del anclaje a la membrana y con función flipasa, que transporta las moléculas de LPG sintetizadas en la cara interna hacia la cara externa de la membrana (Ernst & Peschel, 2011). Se ha propuesto que la parte hidrofóbica es necesaria para que la enzima se posicione de manera correcta cerca de la molécula aceptora (Roy & Ibba, 2009). Para la síntesis de LPG *in vitro* solo es necesaria la parte hidrofílica; sin embargo, se ha observado que para la síntesis del fosfolípido “*in vivo*” son necesarios al menos 6 de los 14 dominios transmembrana (Ernst & Peschel, 2011).

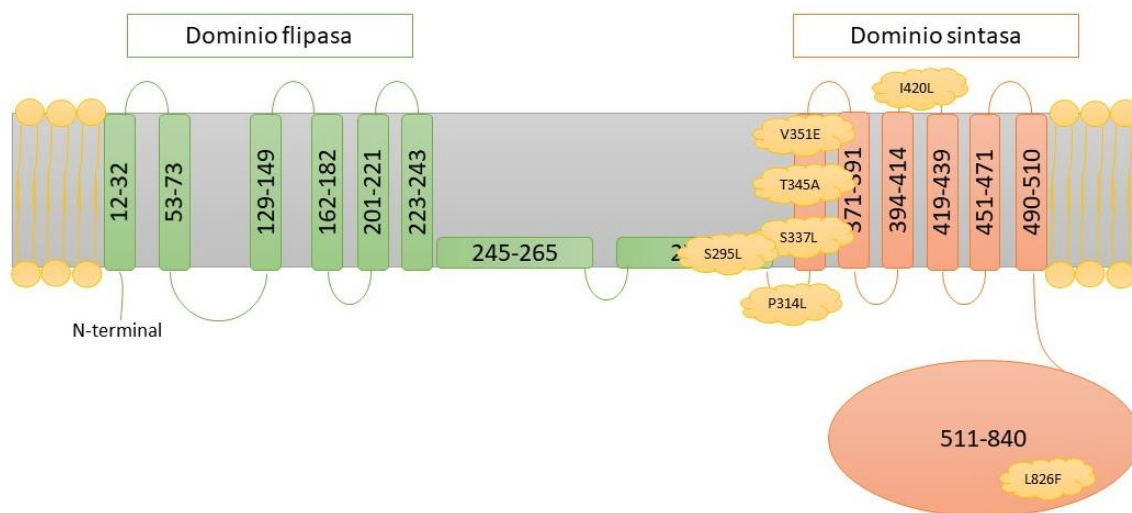


Figura 20. Esquema de la estructura enzimática de *mprF*. Se resaltan en color naranja las mutaciones más frecuentes relacionadas con la resistencia a daptomicina. Imagen de elaboración propia basada en (Ernst & Peschel, 2019).

Mediante estudios de parejas isogénicas sensibles y resistentes a daptomicina, se ha sugerido que un determinado número de mutaciones puntuales (Fig. 20) pueden estar relacionadas con la resistencia a este antibiótico (Bayer et al., 2014; Ernst &

Peschel, 2019; Ernst et al., 2018). Estas mutaciones, algunas consideradas suficientes para la aparición del fenotipo de resistencia, aparecen con mayor frecuencia en la zona de unión de los dominios flipasa y sintetasa, así como en el dominio sintetasa de la proteína. Las mutaciones más frecuentes encontradas en MprF que parecen suficientes para conferir un fenotipo de resistencia a daptomicina son T345A y V351E (Ernst & Peschel, 2019; Ernst et al., 2018). Se pensó que estas mutaciones, y otras similares en la misma región, provocarían un aumento en la síntesis de LPG y su mayor translocación hacia la cara externa de la membrana, provocando una disminución de la carga neta negativa de la membrana celular, lo que induciría la repulsión del complejo DAP-Ca²⁺, impidiendo su unión a la membrana (Miller et al., 2016).

También se ha observado que una mayor presencia de LPG reduce la interacción de daptomicina de manera experimental con vesículas unilamelares, debido a la menor carga neta negativa de esas (Khatib, Stevenson, Yeaman, Bayer, & Pokorny, 2016). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las mutaciones surgidas en esta zona no producen una ganancia de función de la enzima, sino que podrían provocar un cambio conformacional en ella, que impediría una correcta interacción de esta con otro factor de la membrana, el cual interaccionaría con la daptomicina. Se ha observado también que cepas de *S. aureus* resistentes a daptomicina pueden presentar, junto con mutaciones en MprF, variaciones en genes como *yycFG*, *rpoB*, *rpoC*, *vraS* y *dltA* (Ernst & Peschel, 2019; Ernst et al., 2018).

Otro mecanismo para aumentar la carga neta positiva de la envoltura celular es alterando la regulación del operón *dltABCD* (Bayer et al., 2016). Este operón codifica el sistema enzimático encargado de la alanilación de los ácidos teicoicos. Debido a su actividad, mutaciones de ganancia de función en este operón aumentarían la carga positiva disponible en la membrana, y, por repulsión de cargas, daptomicina no sería capaz de unirse a la membrana celular bacteriana. Además, este operón tiene una función adicional ya que, de manera indirecta, regula la función autolítica bacteriana (Cafiso et al., 2014). También se han encontrado mutaciones en este operón que se han asociado con la tolerancia al antibiótico en aislados de *S. aureus* (Mechler et al., 2016). Las cepas tolerantes difieren en las resistentes a los antibióticos en que son incapaces

INTRODUCCIÓN

de crecer en presencia del antibiótico, pero su viabilidad no se ve afectada (Berti et al., 2018).

Otro de los genes importantes relacionado con la aparición de resistencia a daptomicina es *cls2*, que codifica la enzima cardiolipina sintasa (Cls2), encargada de catalizar la condensación de dos moléculas de PG para formar DPG, con la liberación de glicerol (Kuhn et al., 2015). *Staphylococcus aureus* posee dos Cls distintas (Cls1 y Cls2) que codifican la síntesis de DPG. Sin embargo, Cls2 se encarga de sintetizar la mayor parte del contenido de este fosfolípido en la membrana en condiciones normales de crecimiento; bajo condiciones de estrés, sobre todo en medios con un alto contenido en sales, Cls1 se induce y sintetiza DPG (Ohniwa et al., 2013).

Cls pertenece a la clase de enzimas fosfolipasa D (PLD) y consta en su estructura de dos hélices transmembrana y dos dominios fosfolipasa relacionados con la hidrólisis de fosfatidilcolina (PLD1 y PLD2) (Fig. 21) (Ohniwa et al., 2013). Los miembros de la superfamilia PLD comparten los mismos residuos clave que conforman el sitio catalítico de estas enzimas y tienen uno o dos motivos HKD conservados en el centro activo, con un espaciado canónico de HxK(x)₄D. Además, debido a la homología de Cls con la fosfolipasa D, es probable que el centro activo de Cls esté constituido por grupos funcionales aportados tanto por PLD1 como por PLD2, con His217 como supuesto nucleófilo del centro activo (Koprivnjak et al., 2011).

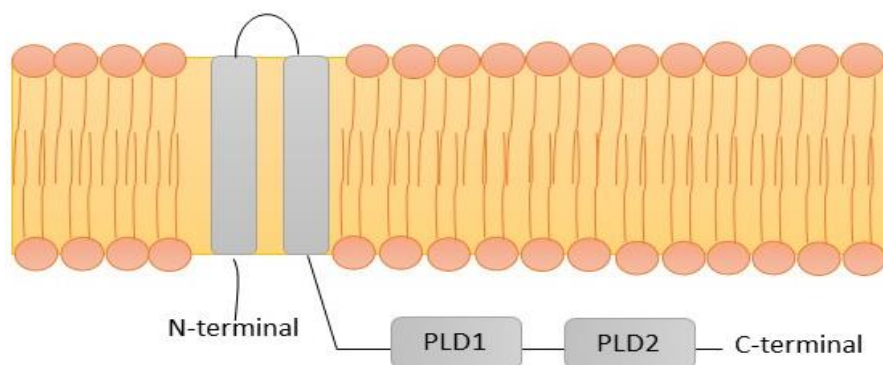


Figura 21. Estructura esquemática de la enzima cardiolipina sintasa. Imagen de elaboración propia basada en (Koprivnjak et al., 2011)

INTRODUCCIÓN

Es importante destacar que en cepas de *S. aureus* en crecimiento activo, PG es el fosfolípido que se encuentra mayoritariamente, en cambio, cuando dichas bacterias entran en fase estacionaria, PG se convierte en DPG llegando a suponer hasta el 30% del total de fosfolípidos en la membrana (Jiang et al., 2019b; Kuhn et al., 2015; Ohniwa et al., 2013). Por ello, la progresión de *S. aureus* desde fase logarítmica a fase estacionaria lleva consigo la conversión de PG a DPG (Koprivnjak et al., 2011).

Un incremento de DPG en la membrana bacteriana debido a mutaciones en el gen *cls2*, puede contribuir a generar resistencia a la daptomicina en *S. aureus* (Zhang et al., 2014) El aumento en la cantidad de DPG en la membrana no altera la carga neta de la membrana, pero sí aumenta su grosor. De esta manera, daptomicina no es capaz de interaccionar adecuadamente con las moléculas de PG presentes, lo que previene la translocación de la daptomicina a la membrana interna e impide la formación completa del poro octamérico, protegiendo las membranas lipídicas de la permeabilización (Jiang et al., 2019b; Zhang et al., 2014).

En *E. faecalis* se ha demostrado un predominio de los fosfolípidos PG y DPG en los septos de división, principal zona de interacción con la daptomicina. Sin embargo, se ha observado que algunos mutantes resistentes al antibiótico reorganizan los fosfolípidos de membrana, desplazando PG y DPG de los septos de división, impidiendo la interacción con la daptomicina sin causar la repulsión del antibiótico (Miller et al., 2016; Tran et al., 2015).

Se han encontrado casos de mutantes resistentes a daptomicina que presentaban una mutación en *agr*, “accessory gene regulator”, un sistema que actúa mediante “quorum-sensing” que regula más de 70 genes en *S. aureus*, algunos de ellos factores de virulencia. Los aislados con mutaciones en este sistema procedían de bacteriemias persistentes con mala respuesta al tratamiento (Paulander et al., 2018; Thompson & Brown, 2017). En ellos se observó una liberación de los fosfolípidos de membrana al medio externo, donde interaccionan con la daptomicina, impidiendo que pueda unirse a la membrana (Pader et al., 2016; Rose, Rybak, Tsuji, Kaatz, & Sakoulas, 2007).

Otro gen relacionado con la resistencia a daptomicina es *yycG*, que codifica un sensor histidina kinasa y es parte de un sistema de dos componentes conjuntamente con el gen *yycF*. Este sistema regula el metabolismo de la pared celular y la formación de biopelículas y es esencial para la viabilidad bacteriana (Baltz, 2009). Las mutaciones en este gen se han asociado con una desregulación del metabolismo de la pared, que conlleva un engrosamiento de esta, impidiendo que la daptomicina interaccione con la membrana bacteriana (Foster, 2017).

Los genes *rpoB* y *rpoC* codifican, respectivamente, las subunidades β y β' de la ARN polimerasa. Las mutaciones observadas en los aislados de *S. aureus* resistentes a daptomicina se han relacionado con un aumento en el grosor de la pared bacteriana y la disminución de la carga neta negativa disponible en la parte externa para la interacción con el antibiótico (Bæk et al., 2015; Cui et al., 2010; Gómez Casanova et al., 2017).

Por otra parte, en *S. aureus*, el regulador de dos componentes *vraSR* controla la transcripción de *pbp2* y la de diversos genes implicados en la síntesis de la pared. Algunos investigadores han observado que los β -lactámicos y otros agentes que afectan a la pared celular pueden inducir la activación de este sistema (Yin, Daum, & Boyle-Vavra, 2006), que cuenta con un ortólogo en la bacteria *E. faecium* llamado LiaFSR, al cual también se le ha asignado un papel en la resistencia a daptomicina en esta especie (Miller et al., 2016). Se ha observado que las mutaciones que aumentan la expresión de este sistema están directamente relacionadas con la baja sensibilidad a daptomicina (Mehta et al., 2012; Taglialegna, Varela, Rosato, & Rosato, 2019).

El sistema de dos componentes GraSR, regula la expresión del operón *dltABCD* y *mprF* en respuestas a péptidos catiónicos, para reducir la carga neta negativa de la envoltura celular bacteriana. Las mutaciones en este gen disminuyen de manera permanente la carga neta negativa de la envoltura celular bacteriana, por lo que pueden provocar resistencia a daptomicina (Müller et al., 2018).

También se han descrito mutaciones en otros genes que, con menor frecuencia, producen resistencia a daptomicina. Estos genes son *prs*, que codifica la fosforibosilprofosfato sintetasa; *clpP*, gen implicado en la degradación de proteínas

anómalas, y *pnpA*, que juega un papel muy importante en la expresión de los genes de virulencia (Song, Rubio, Jayaswal, Silverman, & Wilkinson, 2013).

6.3 Relación entre vancomicina y la resistencia a daptomicina

Se ha descrito que hay una relación estrecha entre la resistencia a vancomicina y a daptomicina en aislados de *S. aureus*, pero con más frecuencia en *Enterococcus faecium* (Miller et al., 2016). Mutaciones en distintos genes, implicados en la resistencia a vancomicina, se han asociado con la aparición de resistencia a daptomicina en pacientes con infecciones causadas por *S. aureus* o *E. faecium* que habían sido tratados con este antibiótico (Chow, Win, Ng, Lee, & Win, 2016; San-Juan et al., 2016).

Los genes más frecuentes asociados con la aparición de resistencia a los dos antibióticos son genes reguladores, como *vraSR*, *dlt* o *walKR*, además de *rpoB* y *rpoC*. Todos estos genes causan un engrosamiento de la pared celular bacteriana o un aumento de la carga positiva en la envoltura celular bacteriana (Foster, 2017).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Dentro del género *Staphylococcus* se encuentran importantes patógenos humanos. Uno de los microorganismos más relevantes en clínica es *Staphylococcus aureus*, causante de un gran número de infecciones, tanto adquiridas en la comunidad como nosocomiales. Sin embargo, en los últimos años también se ha observado que los estafilococos coagulasa negativa han emergido como patógenos oportunistas provocando diversos tipos de infecciones asociados con dispositivos médicos. En este grupo cabe destacar *Staphylococcus capitis*, principal causante de sepsis tardía neonatal en las unidades de cuidados intensivos hospitalarias.

La multirresistencia en este género se ha convertido en un problema clínico de gran relevancia, sobre todo desde la aparición de resistencia a daptomicina, antimicrobiano de naturaleza lipopeptídica utilizado como último recurso frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a β -lactámicos y glucopéptidos.

El mecanismo de acción de la daptomicina no está del todo claro, pero se contempla la interacción de esta con la membrana plasmática de la bacteria, especialmente con PG, el fosfolípido aniónico más abundante en la membrana de *Staphylococcus*. Por esta razón, cambios en los lípidos de membrana o en los grupos acilo que los componen tendrían un papel relevante en el mecanismo de acción de daptomicina, por lo que, de una manera global, hace deducir que los lípidos se consideren muy relevantes en el fenotipo de resistencia a este antibiótico, y que los diversos genes que participan en la síntesis de estos compuestos deben jugar un determinado papel en la misma.

En el caso específico de *S. aureus*, ejemplos claros se hallan en *cls* (cardiolipina sintetasa) y *mprF* (implicado en la formación de LPG); sin embargo, los datos para especies coagulasa negativos como *S. capitis* son muy escasos en la literatura científica, y, generalmente, se refieren solo a mutantes de laboratorio.

Trabajando en la línea marcada en la literatura científica sobre el tema, en la presente tesis estudiamos la composición lipídica de diversos estafilococos para tratar de definir si las posibles variaciones en esta pueden relacionarse con variaciones genéticas en genes relacionados con la síntesis y regulación de los lípidos de membrana en estos microorganismos. A diferencia de la mayoría de trabajos publicados, se

OBJETIVOS

estudian aislados clínicos, obtenidos en un mismo paciente durante un proceso infeccioso y que modificaron su sensibilidad a daptomicina a lo largo del tratamiento. La aproximación experimental se ha basado, esencialmente, en técnicas de espectrometría de masas y de secuenciación del cromosoma.

El objetivo general de esta tesis es relacionar la composición lipídica de *Staphylococcus aureus* y de *S. capitis* con la resistencia a daptomicina, y establecer las bases moleculares (genéticas) de esa resistencia en el ámbito de aislados clínicos obtenidos en un mismo paciente. Los objetivos específicos de esta tesis son:

- ✓ Determinar la relación entre la composición lipídica general de diversos aislados clínicos de *S. aureus*, por un lado, y *S. capitis*, por otro, y su fenotipo de sensibilidad/resistencia a daptomicina.
- ✓ Estudiar la influencia de daptomicina en la composición lipídica de *S. aureus* y *S. capitis* en diversos puntos de la curva de crecimiento y relacionarla con el fenotipo de sensibilidad/resistencia a este antibiótico.
- ✓ Conocer las variaciones genéticas existentes entre aislados sensibles y resistentes a daptomicina de *S. aureus* y *S. capitis*, a través de la secuenciación y comparación de sus genomas, y relacionar estas con el fenotipo de sensibilidad/resistencia al antibiótico y con la composición lipídica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ámbito del estudio, identificación y antibiograma.

Se han estudiado cinco cepas de *S. aureus* (SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5) y cuatro cepas de *S. capitis* (SC32, SC33, SC34 y SC35), aisladas de dos pacientes ingresados en el Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Arrixaca” que presentaron diferente grado de sensibilidad a daptomicina.

Las cinco cepas de *S. aureus* se obtuvieron de hemocultivos seriados de un paciente con endocarditis. El paciente fue tratado inicialmente con daptomicina y linezolid y tras aislar una cepa resistente a daptomicina, se le cambió el tratamiento a vancomicina, fosfomicina y linezolid (Fig. 22).

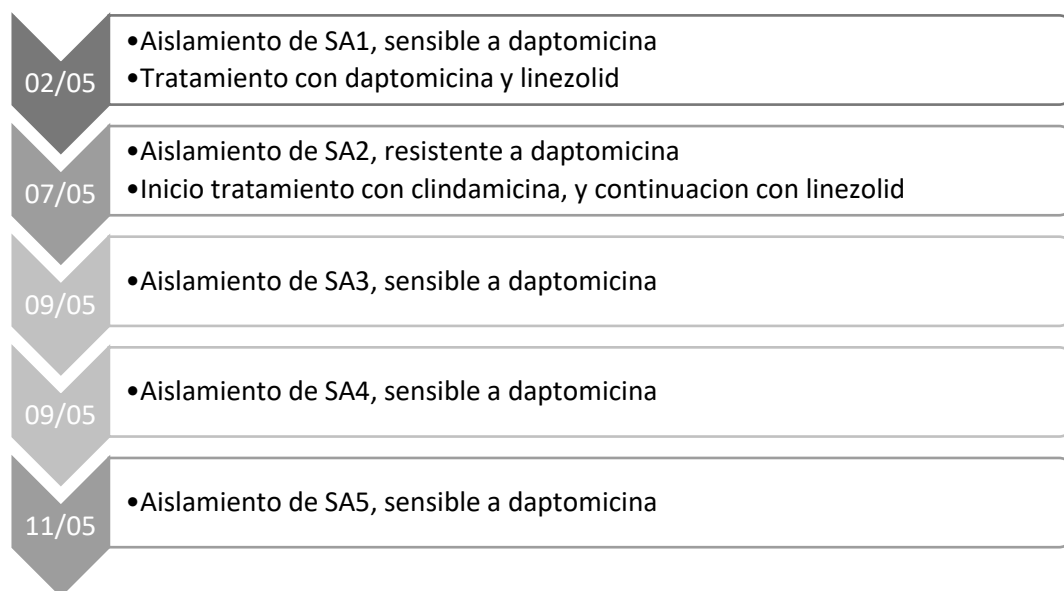


Figura 22. Secuencia de aislamientos de *S. aureus* en el paciente.

Por otra parte, las cuatro cepas de *S. capitis* se aislaron de hemocultivos seriados de un paciente con ventriculitis. El paciente fue tratado, inicialmente, con vancomicina y piperacilina/tazobactam y, más tarde, con linezolid (Fig. 23). Daptomicina no se empleó en ningún momento a lo largo del proceso.

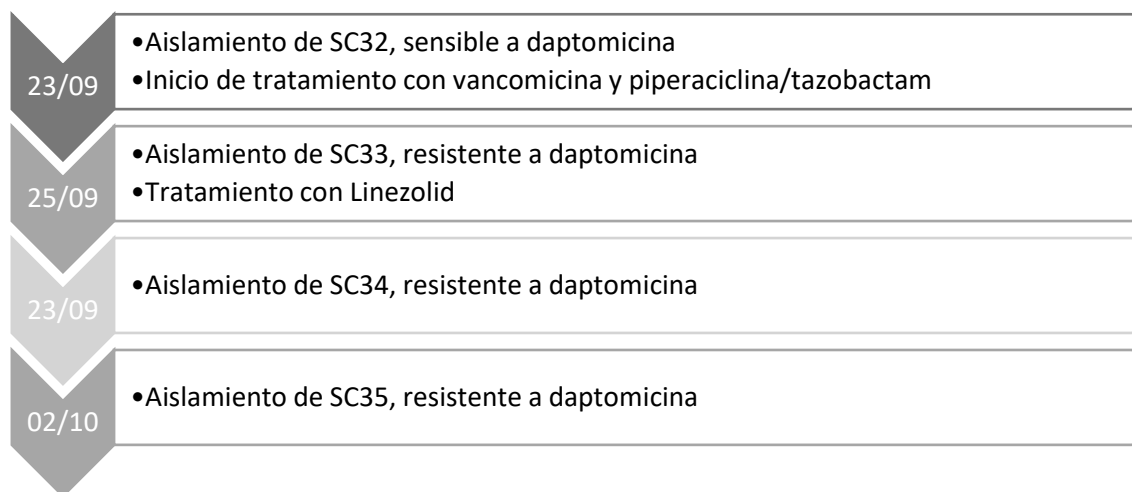


Figura 23. Secuencia de aislamientos de *S. capitis* en el paciente

La identificación y la sensibilidad antibiótica de estos microorganismos se realizó siguiendo los protocolos habituales del servicio de Microbiología del citado hospital mediante el sistema automatizado Vitek2®, utilizando las tarjetas GP y AST-626 (bioMérieux), respectivamente. Este sistema lleva a cabo la identificación bioquímica y sensibilidad microbiana mediante tarjetas con micropocillos que utilizan sustratos enzimáticos para el caso de la identificación y un sistema de microdilución para realizar la sensibilidad antibiótica. La tarjeta GP permite la identificación de una amplia gama de patógenos Gram-positivos clínicamente relevantes. Los antibióticos testados mediante la tarjeta AST-626 fueron: bencilpenicilina, oxacilina, gentamicina, tobramicina, levofloxacino, clindamicina, eritromicina, linezolid, daptomicina, vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, fosfomicina, ácido fusídico, rifampicina y trimetropima/sulfametoxazol.

También se utilizó el Etest® como método adicional para comprobar la sensibilidad de *S. aureus* y *S. capitis* a daptomicina. Las tiras de Etest® usadas presentan un gradiente de concentración del antimicrobiano a ensayar, la daptomicina en este caso, y permiten conocer la CMI para cada una de las cepas. Para ello, se usaron placas de agar Mueller-Hinton (bioMérieux) inoculadas con una suspensión bacteriológica a una concentración del 0,5 McFarland, sobre las que se colocó una tira de daptomicina. Tras 24 horas de incubación se realizó la lectura. Para ello, se observó la “elipse de inhibición” que se produce alrededor de la tira del antibiótico y la concentración en la

que el crecimiento bacteriano corta a la tira de daptomicina. Ese punto de corte con la tira es la CMI para esa cepa, expresada en $\mu\text{g/ml}$.

Los criterios utilizados, tanto para el sistema Vitek2® como para Etest®, para realizar la categorización clínica a daptomicina fueron los del EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019), que define el punto de corte de la resistencia a daptomicina en concentraciones mayores a $1 \mu\text{g/ml}$. Cada una de las cepas estudiadas se clasificó como sensible o resistente en función de su CMI para la daptomicina.

A los aislados de *S. aureus* se les realizó la detección rápida de la proteína de fijación a penicilina 21 (PBP2a) mediante inmunoensayo cromatográfico cualitativo (PBP2a SA Alere®), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se leyeron visualmente al cabo de 5 minutos.

2. Extracción y análisis de lípidos.

2.1 Análisis preliminar de la composición de lípidos en medio Mueller-Hinton sólido 24h

En un primer análisis se estudió la composición lipídica de las cinco cepas de *S. aureus* y las cuatro cepas de *S. capitis* tras 24 horas de cultivo a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en medio agar Mueller-Hinton (bioMérieux).

Se realizaron tres cultivos independientes de cada una de ellas, separados entre sí dos semanas y un mes. Tras recoger las bacterias de las placas, los lípidos se extrajeron durante 24h a $5 \text{ }^\circ\text{C}$, sucesivamente, en cloroformo/metanol (1/2, v/v), cloroformo/metanol (1/1, v/v) y cloroformo/metanol (2/1, v/v). Se emplearon tubos de vidrio con tapón de rosca y sello de teflón. Tras combinar los extractos lipídicos, la proporción de disolventes se ajustó a cloroformo/metanol/ H_2O (4/2/1, v/v/v) y la fase clorofórmica inferior se recuperó en un nuevo tubo, evaporándose a sequedad en atmósfera de N_2 a $40 \text{ }^\circ\text{C} - 50 \text{ }^\circ\text{C}$. El extracto se disolvió en 2 mL de cloroformo/metanol 2/1 (v/v). Un 1 mL se empleó para análisis mediante espectrometría de masas con

ionización mediante 'electrospray' y tiempo de vuelo (ESI-TOF-MS) (fosfolípidos, glicolípidos, diacilglicerol y ácidos grasos libres) y otra para análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (ésteres metílicos de ácidos grasos).

La técnica de ESI-TOF-MS se realizó en un espectrómetro serie 6220 (Agilent), conectado a un HPLC serie 1200 (Agilent) (ACTI, Área Científico Técnica de Investigación, Universidad de Murcia), utilizando inserción directa y modo negativo de análisis; como fase móvil (0,4 mL/min) se empleó metanol/H₂O (75:25, v/v), conteniendo 0,1% de ácido fórmico y 0,5 mM de formiato amónico. Los espectros se adquirieron en condiciones estándar y método centroide, en un rango de masas de 100-2000. Los distintos lípidos se identificaron de acuerdo con su masa monoisotópica (Tablas 3 a 10) calculada en la web de ChemCalc (Patiny & Borel, 2013).

PG, DPG, LPG, glicerolfosfato-diglicosildiacylglicerol (GP-GL) y AGL se observan en los espectros como iones (M-H)⁻; además, DPG también dio iones (M-2H)⁻². Diacylglicerol (DAG) y diglicosildiacylglicerol (GL) se detectaron como aductos de formiato (M+45)⁻ y cloruro (M+35)⁻. La cuantificación de cada componente se realizó con ayuda del programa Excel[®] y se obtuvo teniendo en cuenta el área total de los iones ('Total Ion Chromatogram': TIC) y la intensidad de cada uno de los compuestos, tras identificarlos por su masa monoisotópica exacta teórica (error admitido ≤ 5 ppm), expresando los datos como Intensidad Normalizada (IN) = suma de las intensidades de los diferentes iones de un compuesto/TIC correspondiente.

Para la comparación de la composición lipídica entre cepas se empleó la fórmula IN cepa resistente/IN cepa sensible; en ciertos casos se compararon los valores de IN para una misma cepa cultivada en distintas condiciones –p. ej. ensayo/control, a las 4h y a las 24h de cultivo en presencia/ausencia de daptomicina-. Los análisis comparativos mediante ESI-TOF-MS entre cualesquiera dos cepas se realizaron el mismo día, en un intervalo de 10 minutos, empleando la misma calibración del sistema y las mismas condiciones experimentales. Como se ha indicado, los análisis se realizaron por triplicado (tres cultivos distintos, realizados a lo largo de aproximadamente un mes).

2.2 Estudio de la influencia de daptomicina en la composición de lípidos

La posible influencia de daptomicina en la composición lipídica de los estafilococos estudiados se analizó en las cepas de *S. aureus* SA1 y SA2 y en las de *S. capitis* SC32 y SC35. Para ello se partió de una placa de cultivo en Mueller-Hinton agar (bioMérieux) de 24h/37 °C, cuyo contenido total se incubó seguidamente en 30 mL de Mueller-Hinton caldo (Conda/Pronadisa) (suplementado con 50 µg/mL de CaCl₂) a 37 °C/4 h o 24 horas, sin agitación. La daptomicina se adicionó en condiciones estériles a la CMI de cada una de las cepas estudiadas. Para los cultivos de SA1 se usó una concentración de 0,25 µg/ml; para SA2 se usó una concentración de 1,5 µg/mL. Por otra parte, para los cultivos de SC32 y SC35 se emplearon las concentraciones de 0,5 µg/mL y 1,5 µg/mL respectivamente. También se emplearon como control cultivos similares sin el antibiótico.

Tras los cultivos, las bacterias se recogieron por centrifugación (4000 rpm/20 min), se lavaron con solución salina y se centrifugaron de nuevo. Los distintos lípidos se extrajeron y analizaron como se ha descrito en el apartado anterior.

Tabla 3. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de PG presentes en *S. capitis* y *S. aureus*.

Fosfatidilglicerol (PG)	Masa exacta teórica	Combinación de ácidos grasos
C ₃₆ H ₇₀ O ₁₀ P	693,4706	C ₁₅ + C ₁₅
C ₃₇ H ₇₂ O ₁₀ P	707,4863	C ₁₆ + C ₁₅
C ₃₈ H ₇₄ O ₁₀ P	721,5019	C ₁₇ + C ₁₅
C ₃₉ H ₇₆ O ₁₀ P	735,5176	C ₁₈ + C ₁₅
C ₄₀ H ₇₈ O ₁₀ P	749,5332	C ₁₉ + C ₁₅
C ₄₁ H ₈₀ O ₁₀ P	763,5489	C ₂₀ + C ₁₅
C ₄₂ H ₈₂ O ₁₀ P	777,5645	C ₂₁ + C ₁₅

Tabla 4. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de DPG presentes en *S. capitis* y *S. aureus*.

Difosfatidilglicerol (DPG)	Masa exacta teórica	Combinación de ácidos grasos
C ₆₉ H ₁₃₃ O ₁₇ P ₂	1295,9018 / 647,9509	4xC ₁₅

MATERIALES Y MÉTODOS

$C_{70}H_{135}O_{17}P_2$	1309,9175 / 654,9586	$C_{15} + C_{16} + 2xC_{15}$
$C_{71}H_{137}O_{17}P_2$	1323,9331 / 661,9666	$2xC_{16} + 2xC_{15}$
$C_{72}H_{139}O_{17}P_2$	1337,9487 / 668,9744	$C_{16} + C_{17} + 2xC_{15}$
$C_{73}H_{141}O_{17}P_2$	1351,9666 / 675,9833	$2xC_{17} + 2xC_{15}$
$C_{74}H_{143}O_{17}P_2$	1365,9800 / 682,9900	$C_{18} + C_{17} + 2xC_{15}$
$C_{75}H_{145}O_{17}P_2$	1379,9957 / 689,9979	$2xC_{18} + 2xC_{15}$
$C_{76}H_{147}O_{17}P_2^-$	1394,0113/	$C_{19} + C_{18} + 2xC_{15}$
$C_{77}H_{149}O_{17}P_2^-$	1408,0270/	$2xC_{19} + 2xC_{15}$

Tabla 5. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de LPG presentes en *S. capitis* y *S. aureus*.

Lisilfosfatidilglicerol (LPG)	Masa exacta teórica	Combinación de ácidos grasos
$C_{42}H_{82}O_{11}PN_2$	821,5656	$C_{15} + C_{15}$
$C_{43}H_{84}O_{11}PN_2$	835,5812	$C_{16} + C_{15}$
$C_{44}H_{86}O_{11}PN_2$	849,5969	$C_{17} + C_{15}$
$C_{45}H_{88}O_{11}PN_2$	863,6125	$C_{18} + C_{15}$
$C_{46}H_{90}O_{11}PN_2$	877,6282	$C_{19} + C_{15}$

Tabla 6. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de GL presentes en *S. capitis* y *S. aureus*.

Diglicosidiacilglicerol (GL)	Masa exacta teórica	Combinación de ácidos grasos
$C_{45}H_{84}O_{15}Cl / C_{45}H_{84}O_{15}CO_2H$	899,5498 / 909,5786	$C_{15} + C_{15}$
$C_{46}H_{86}O_{15}Cl / C_{46}H_{86}O_{15}CO_2H$	913,5655 / 923,5943	$C_{16} + C_{15}$
$C_{47}H_{88}O_{15}Cl / C_{47}H_{88}O_{15}CO_2H$	927,5811 / 937,6099	$C_{17} + C_{15}$
$C_{48}H_{90}O_{15}Cl / C_{48}H_{90}O_{15}CO_2H$	941,5968 / 951,6256	$C_{18} + C_{15}$
$C_{49}H_{92}O_{15}Cl / C_{49}H_{92}O_{15}CO_2H$	955,6124 / 965,6412	$C_{19} + C_{15}$

Tabla 7. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de DAG presentes en *S. capitis* y *S. aureus*.

Diacilglicerol (DAG)	Masa exacta teórica	Combinación de ácidos grasos
$C_{35}H_{68}O_5Cl / C_{35}H_{68}O_5CO_2H$	603,4755 / 613,5043	$C_{17} + C_{15}$

MATERIALES Y MÉTODOS

$C_{36}H_{70}O_5Cl / C_{36}H_{70}O_5CO_2H$	617,4911 / 627,5199	$C_{18} + C_{15}$
$C_{37}H_{72}O_5Cl / C_{37}H_{72}O_5CO_2H$	631,5068 / 641,5356	$C_{19} + C_{15}$
$C_{38}H_{74}O_5Cl / C_{38}H_{74}O_5CO_2H$	645,5224 / 655,5512	$C_{20} + C_{15}$

Tabla 8. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de GP-GL presentes en *S. capitis* y *S. aureus*.

diglicosildiácilglicerol (GP-GL)	Masa exacta teórica	Combinación de ácidos grasos
$C_{48}H_{90}O_{20}P$	1017,5763	$C_{15} + C_{15}$
$C_{49}H_{92}O_{20}P^-$	1031,5919	$C_{16} + C_{15}$
$C_{50}H_{94}O_{20}P^-$	1045,6076	$C_{17} + C_{15}$
$C_{51}H_{96}O_{20}P^-$	1059,6232	$C_{18} + C_{15}$
$C_{52}H_{98}O_{20}P^-$	1073,6389	$C_{19} + C_{15}$

Tabla 9. Fórmula empírica y masa monoisotópica exacta-teórica de las diferentes especies moleculares de AGL presentes en *S. capitis* y *S. aureus*.

Ácidos grasos libres (AGL)	Masa exacta teórica
$C_{14}H_{27}O_2$	227,2011
$C_{15}H_{29}O_2$	241,2167
$C_{16}H_{31}O_2$	255,2324
$C_{17}H_{33}O_2$	269,2481
$C_{18}H_{35}O_2$	283,2637
$C_{19}H_{37}O_2$	297,2794
$C_{20}H_{39}O_2$	311,2950
$C_{21}H_{41}O_2$	325,3107

3. Análisis de ácidos grasos.

Los grupos acilo de los lípidos se estudiaron como ésteres metílicos de ácidos grasos, tras ser hidrolizados por metanólisis ácida en metanol seco/tolueno/ácido sulfúrico (30:15:1, v/v/v), 1h/75 °C. La extracción se llevó a cabo con hexano y los extractos obtenidos se evaporaron a sequedad bajo atmósfera de N_2 /60 °C. Las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-

MS) en un sistema 7890/5973 GC/MS (Agilent) (ACTI, Universidad de Murcia). La temperatura del inyector fue de 250 °C y la de la línea de transferencia 280 °C. Se usó la columna HP-5 MS de dimensiones 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, cuya temperatura se programó desde 60 °C a 270 °C (6 °C/min). Los distintos compuestos fueron identificados de acuerdo con sus tiempos de retención y espectros de masas.

La cuantificación se da en porcentajes, calculados teniendo en cuenta el área de cada uno de ellos con respecto al área total, empleando la herramienta Excel®. Los análisis se realizaron por triplicado (tres cultivos distintos).

4. Distribución de los grupos acilo en los lípidos de membrana

Se estudió mediante espectrometría de masas/masas, empleando un espectrómetro de masas 6550 Q-TOF (Agilent) conectado a un cromatógrafo 1290 Infinity II Series (Agilent) (ACTI, Universidad de Murcia). Se inyectaron directamente 20 µL de las muestras en el espectrómetro de masas. El solvente utilizado fue (50:50 v/v) Agua MiliQ -conteniendo 0,1% de ácido fórmico- y acetonitrilo -conteniendo 0,1% de ácido fórmico- con un flujo de 0,4 mL/min a 40 °C durante 2 min.

Los espectros de masas se obtuvieron en modos negativo y positivo; el fragmentador, inyector y octopolo trabajaron a 3500V, 500V, 220V y 750V respectivamente. El rango de masas analizado fue de 100-2000 m/z en modo "scan". El sistema está provisto de un software MassHunter Workstation Data Acquisition (Agilent) y otro MassHunter Qualitative Analysis Navigator (Agilent) para el análisis y cuantificación de los datos.

5. Análisis estadístico de la composición lipídica

Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS v. 24 en todos los casos. La comparación de medias en los análisis lipídicos de las 5 cepas de *S. aureus*, por un lado, y de los cuatro aislados de *S. capitis*, por otro, se realizó mediante un ANOVA, empleando la corrección de Bonferroni (tras el análisis de homogeneidad de varianzas);

en el resto de los análisis se aplicó la prueba t de Student. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias para una $P < 0.05$.

6. Secuenciación masiva y análisis bioinformático de los cromosomas de algunos aislados

Se secuenciaron los cromosomas de los aislados SA1 y SA2 de *S. aureus* y de los aislados SC32 y SC35 de *S. capitis*.

La extracción de ADN se realizó a partir de un cultivo de 16h en medio agar Mueller-Hinton (bioMérieux). Para ello, se preparó una suspensión bacteriológica a una concentración del 3-4 McFarland en buffer TE [10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA (pH 8)], se centrifugó (3500 rpm/30 min) y el pellet bacteriano se resuspendió en 400 μ L de TE. Se añadieron 25 μ L de lisozima (100 mg/mL) y se incubó 2h/37°C. Para la extracción de ADN se utilizó la técnica automatizada Maxwell® 16 Promega, basada en el uso de partículas de sílice magnéticas, haciendo uso del kit '*Maxwell® 16 blood DNA purification*'.

Los ADNs se enviaron al Servicio de Secuenciación Masiva y Bioinformática del FISABIO (Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana), donde se realizó una librería de ADN siguiendo el protocolo Nextera XT de illumina (Nextera XT Library Prep kit (FC-131-1024). El protocolo se inició con 0,2 ng/ μ l de ADN purificado y las etapas de la secuenciación masiva se realizaron mediante el kit Nextera XT (FC-131-1096), obteniendo fragmentos secuenciados por los dos extremos por duplicado de 300pb. La librería se obtuvo utilizando el secuenciador MiSeq de acuerdo con el protocolo de Illumina (MiSeq v3 reagent kit, MS-102-3003).

Para el ensamblaje y mapeo de las variantes obtenidas se utilizó la herramienta bioinformática Snippy, versión 4.3.8, usando los genomas de *S. aureus* CP001844 y de *S. capitis* AYP 1020; se realizaron 5 rondas de mapeos de los fragmentos obtenidos reorganizados a partir de estos genomas de referencia. La anotación del genoma de las cepas se consiguió con la herramienta Prokka, versión 1.13.3.

El genoma completo de los aislados de *S. capitis* se depositaron en la web figshare. El número de acceso para el genoma de SC32 <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.9929198.v1>. Para el genoma de SC35, el número de acceso es <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.10002479.v2>. Estos genomas también se subieron a la web ENA, “European Nucleotide Archive”, cuyos números de acceso para SC32 y SC35 son respectivamente ERS3567517 y ERS356718, y Genbank cuyos números de acceso para SC32 y SC35 son respectivamente CABHLU010000000 y CABHLT010000000.

Por otra parte, los genomas de los aislados SA1 y SA2 también se incluyeron en la web figshare. El número de acceso para el genoma del aislado SA1 es <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11881194.v1>, y el número de acceso para el genoma de SA2 es <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11881209.v1>.

7. Confirmación de las variantes (SNPs) detectadas en la secuenciación de los cromosomas: extracción de ADN, amplificación y secuenciación de genes.

Las confirmaciones de las variantes observadas mediante secuenciación del genoma se realizaron en la plataforma de Genómica del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB). Para ello se realizó la extracción del ADN de los aislados estudiados siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior con el sistema automatizado Maxwell® 16 Promega.

La amplificación del ADN por PCR se llevó a cabo en el termociclador SIMPLIAMP (Applied Biosystems), utilizando los “primers” descritos en las tablas 10 y 11, con las siguientes condiciones:

- Para los genes *tlyC*, *dhbC*, *rnj2*, *Cadena 1 ATP sintasa* y *qacB* de los aislados de *S. capitis* se realizó 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C/2min, seguidos de 30 ciclos de 30s/62°C, y posteriormente 1min/72°C. Finalmente se enfriaron a 4°C.

- Para los genes *purR* y *ebhB* estudiados en los aislados de *S. aureus* se realizó en las mismas condiciones, pero la temperatura de alineamiento fue de 65°C. Aun así, el

MATERIALES Y MÉTODOS

gen *ebhB* aparecía como doble banda, por lo que se purificó la banda adecuada, de 482 pb, en gel de agarosa al 1% (QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)).

- Para la amplificación del gen *mprF* de los aislados de *S. aureus*, se realizó 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C /5min, seguido de 30 ciclos de 30 segundos/94°C, 1 minuto/50°C y 1 minuto/72°C, y por último 1 ciclo de elongación final a 72°C /2min.

La PCR se realizó con un volumen final de 25 µL, conteniendo 15,5 µL de agua miliQ, 2,5 µL de buffer 10X, 0,5 µL de dNTPs, 0,1 µL de Taq polimerasa (2U), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 5 µL de ADN extraído y 0,5 µL de cada primer.

Los productos de PCR obtenidos se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%/ TAE 1X. Al gel se le añadió, además, 10 µL de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) a una concentración 1/1000000, para permitir la visualización posterior del ADN. La electroforesis se llevó a cabo en la cubeta Sub-Cell® GT (Bio Rad). Se cargaron 2 µL de cada producto de PCR amplificado con un marcador de peso molecular de 1 kb. La electroforesis se realizó durante 30 min/140V/400A, utilizando la fuente de alimentación PowerPac® Basic. La visualización del gel se llevó a cabo en el transiluminador Chemidoc (Biorad).

Los productos amplificados se purificaron mediante el método enzimático ExoSap-IT (Qiagen). Para ello, a 15 µL de producto de PCR se le añadieron 26 µL del reactivo ExoStop, y la mezcla de reacción se dejó incubando 15 min/37 °C y 15 min/80°C. El producto purificado resultante se utilizó para la secuenciación de los fragmentos de ADN en el analizador de 8 capilares ABI 3500 (Applied Biosystems).

La reacción de secuenciación se realizó con dideoxynucleótidos BigDyes v3.1 (Applied Biosystems) usando 2 µL de Bigdyes, 1 µL de "primers" F/R (2,5 mM) y 2 µL de producto de PCR purificado a 94°C, 3 min, 25 ciclos de 96°C, 10s, 50°C 5s y 60°C, 4 min, enfriando a 10°C. A continuación, se añadieron 5µL de agua para llevar a un volumen final de 10 µL y se procedió a su purificación en las columnas "Performa Gel Filtración Cartidges" (Edge BIO). Seguidamente, se añadió 10 µL de formamida desionizada y se secuenció.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las secuencias obtenidas se visualizaron con el programa Chromas y se compararon con los genes de referencia, utilizando la herramienta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zhang, Schwartz, Wagner, & Miller, 2000).

Tabla 10. “Primers” utilizados para comprobar las mutaciones observadas por secuenciación masiva en los aislados de *S. capitis*.

Gen	Primer	TM
<i>tlyC</i>	F-TATTGCAGGACGAGAAGGTG	58,87
<i>dhbC</i>	F -TACAAAGACGATTGGCGAGA	59,42
<i>rnJ2</i>	R- GCACTTTTTCTTCGGCTTCA	60,50
<i>Cadena I ATP sintasa</i>	F- TTGTGACAAAAATGCCGTAAA	59,11

Tabla 11. “Primers” utilizados para comprobar las mutaciones observadas por secuenciación masiva en los aislados de *S. aureus*.

Gen	Primer	TM
<i>purR</i>	F- CGAAGCGAGAGAATTGTTTT	58,64
<i>ebhB</i>	F- AGTTCAAACAGCAGGCAACC	60,30
<i>mprF</i>	F – GTGGGGCATCGCTTGTTATTC	

8. Estudio del grosor de la envoltura celular

Se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión, en células cultivadas en Mueller-Hinton líquido (Conda, Pronadisa), 16 h/ 37 °C, a una concentración ajustada a 3-4 en la escala McFarland. El protocolo de fijación se realizó en el Servicio de Microscopía del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia.

Las muestras se centrifugaron y el pellet obtenido se trató con tetraóxido de osmio al 1 %/4 °C durante 2-3h. A continuación, se realizó un lavado en tampón cacodilato + sacarosa durante 12h. Después las muestras se trataron 2h con acetato de uranilo y posteriormente se hicieron lavados con concentraciones crecientes de alcohol (30%, 50%, 70% y 90%), a temperatura ambiente cada 50 minutos. A continuación, se

realizaron dos lavados con alcohol absoluto + sulfato de cobre durante 50 minutos y otros dos lavados con óxido de propileno 15 minutos. Tras estos lavados, las muestras se trataron tres veces con resina spur y óxido de propileno, primero en proporción 1:2 45 minutos, 1/1 2h y finalmente 2/1 2h. Finalmente, se trataron con spur puro toda la noche y las cápsulas se realizaron con Epon puro, resina epoxi, y se mantuvieron toda la noche a 70°C.

Las secciones finas y ultrafinas fueron cortadas con el Ultramicrotomo Leica UC6. Los cortes semifinos de 1 µm fueron teñidos con azul de toluidina, mientras que los cortes ultrafinos de 70 nm se utilizaron rejillas de cobre de 200 mesh y después fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

Las imágenes realizadas se tomaron con el microscopio JEOL 1011 a 80KV, asociado a la cámara digital Gatan Orion.

9. Análisis de imagen

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica fueron tratadas en el servicio de análisis de imagen de la ACTI, Universidad de Murcia, utilizando el equipo MIP4.5 Sony dxc 151-ap. La video cámara conectada al microscopio era el modelo Olympus SZ11, Software MIP4 Advanced (Microm Image Processing Software, Digital Image Systems, Barcelona, España).

En primer lugar, se realizó una calibración morfométrica para poder equiparar las mediciones realizadas en la imagen a las realizadas sobre el objeto real. A continuación, se realizaron 15 medidas de la pared celular en cada imagen obtenida y finalmente se calculó la media de las longitudes obtenidas para los distintos tratamientos mediante el programa Excel®. Para la estadística de los resultados se empleó la t-Student y el paquete estadístico anteriormente indicado para lípidos.

RESULTADOS

*Staphylococcus aureus*1 Sensibilidad antibiótica

Los cinco aislados de *Staphylococcus aureus* estudiados en este ensayo, SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5, presentaron el mismo perfil de sensibilidad a los distintos antibióticos testados mediante el sistema Vitek2®, excepto para los antibióticos daptomicina y oxacilina (Tabla 12).

Tabla 12. Antibiograma (Vitek2®) de las diferentes cepas de *S. aureus*, e interpretación de los resultados (S: sensible y R: resistente). La concentración se expresa en µg/mL. Se destaca en negrita la CMI obtenida para el antibiótico daptomicina en todos los aislados.

Antibióticos	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5
Bencilpenicilina	>=0,5 R	>= 0,5 R	>= 0,5 R	>= 0,5 R	>= 0,5 R
Oxacilina	>= 4 R	1 S	1S	>= 4 R	>= 4 R
Gentamicina	<=0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S
Tobramicina	<=1 S	<=1 S	<=1 S	<=1 S	<=1 S
Levofloxacino	0,25 S	0,25 S	0,25 S	0,25 S	0,25 S
Eritromicina	1 S	1 S	1 S	1 S	1 S
Linezolid	2 S	2 S	2 S	2 S	2 S
Daptomicina	0,25 S	4 R	1 S	0,25 S	0,25 S
Vancomicina	1 S	1 S	1 S	1 S	1 S
Teicoplanina	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S
Tigeciclina	<= 0,12 S	<= 0,12 S	<= 0,12 S	<= 0,12 S	<= 0,12 S
Fosfomicina	16 S	16 S	<=8 S	<=8 S	16 S
Ácido fusídico	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S
Mupirocina	<= 2 S	<= 2 S	<= 2 S	<= 2 S	<= 2 S
Rifampicina	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S	<= 0,5 S
Trimetoprima/ sulfametoxazol	<= 10 S	<= 10 S	<= 10 S	<= 10 S	<= 10 S

Los aislados *S. aureus* 1 (SA1), *S. aureus* 4 (SA4) y *S. aureus* 5 (SA5) se consideraron, de acuerdo con la normativa de EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019), sensibles a daptomicina y resistentes a oxacilina. El aislado *S. aureus* 2 (SA2) fue resistente a daptomicina, con una CMI de 4

RESULTADOS

µg/ml, y sensible a oxacilina (efecto “seesaw”). El aislado *S. aureus* 3 (SA3) presentó una CMI a daptomicina de 1 µg/ml, siendo catalogado como sensible, y una CMI de 1 µg/ml a oxacilina.

Estos resultados se comprobaron mediante E-test® (Fig. 24). Las dos técnicas mostraron concordancia en cuanto a la categorización de los aislados en sensibles o resistentes a los dos antibióticos, aunque con ligeras diferencias en los valores de las CMI (Tabla 13).

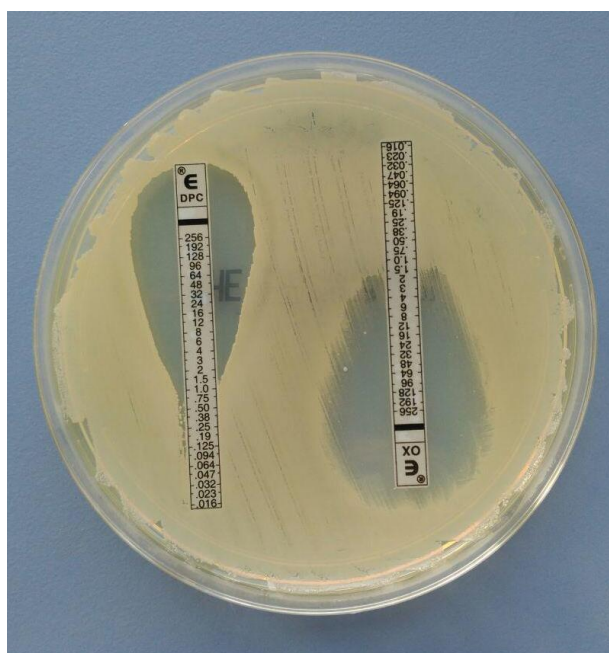


Figura 24. Ejemplo de E-test realizado a SA2 de daptomicina y oxacilina. Imagen propia.

Tabla 13. Comparación entre los resultados obtenidos mediante los métodos Vitek® y E-test® en los aislados de *S. aureus*. La concentración se expresa en µg/mL.

	Daptomicina		Oxacilina	
	Vitek	E-test	Vitek	E-test
SA1	0,25	0,25	4	4
SA2	4	1,5	1	1
SA3	1	1	1	1,5
SA4	0,5	0,25	4	4
SA5	0,5	0,25	4	16

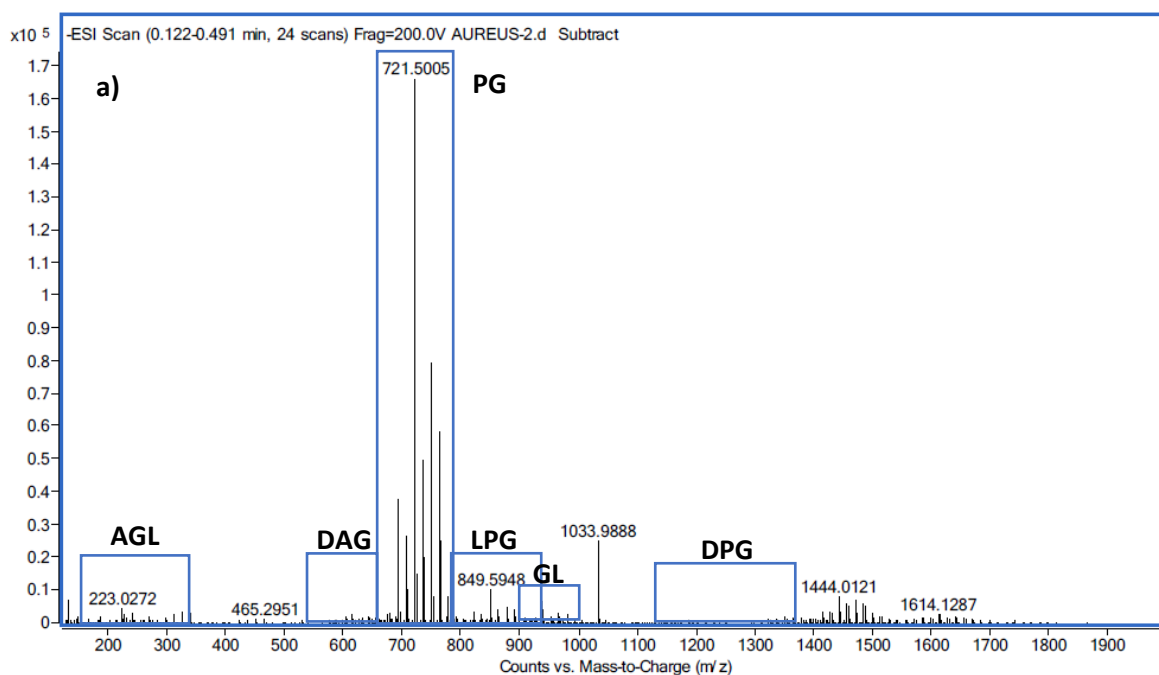
RESULTADOS

Ante la pérdida y de nuevo la adquisición de resistencia a oxacilina en estos aislados se realizó el test rápido de expresión de PBP, el cual dio un resultado positivo incluso en aquellas que revirtieron la sensibilidad a oxacilina.

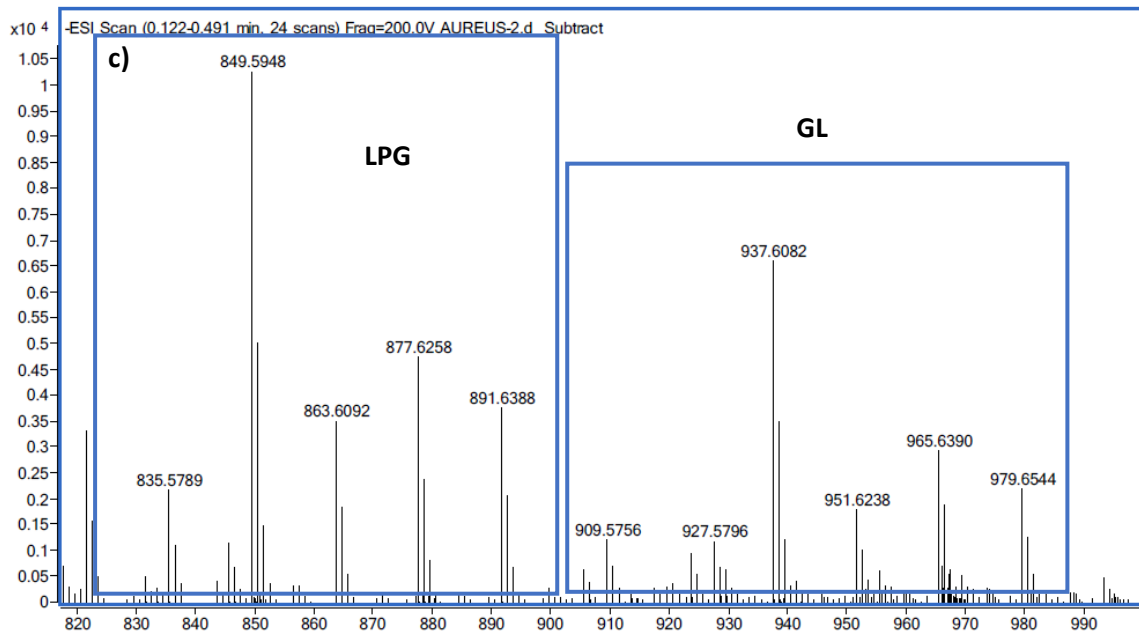
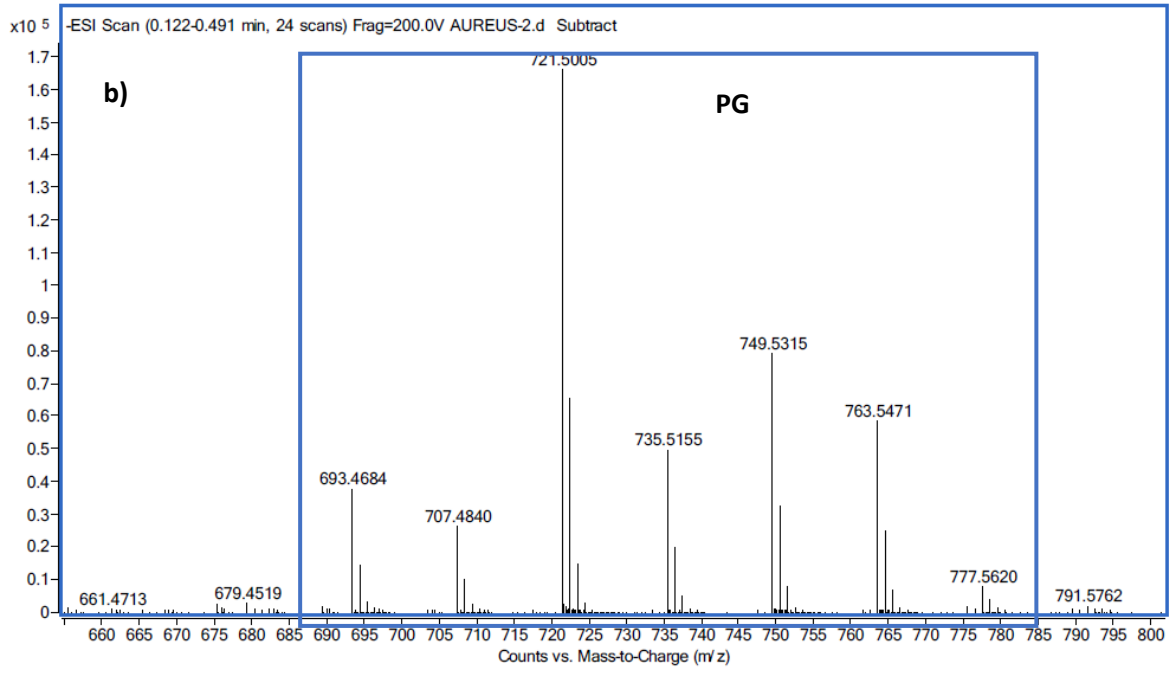
2. Composición general de lípidos en los cinco aislados de *Staphylococcus aureus* (24h MH agar)

2.1 ESI-TOF-MS

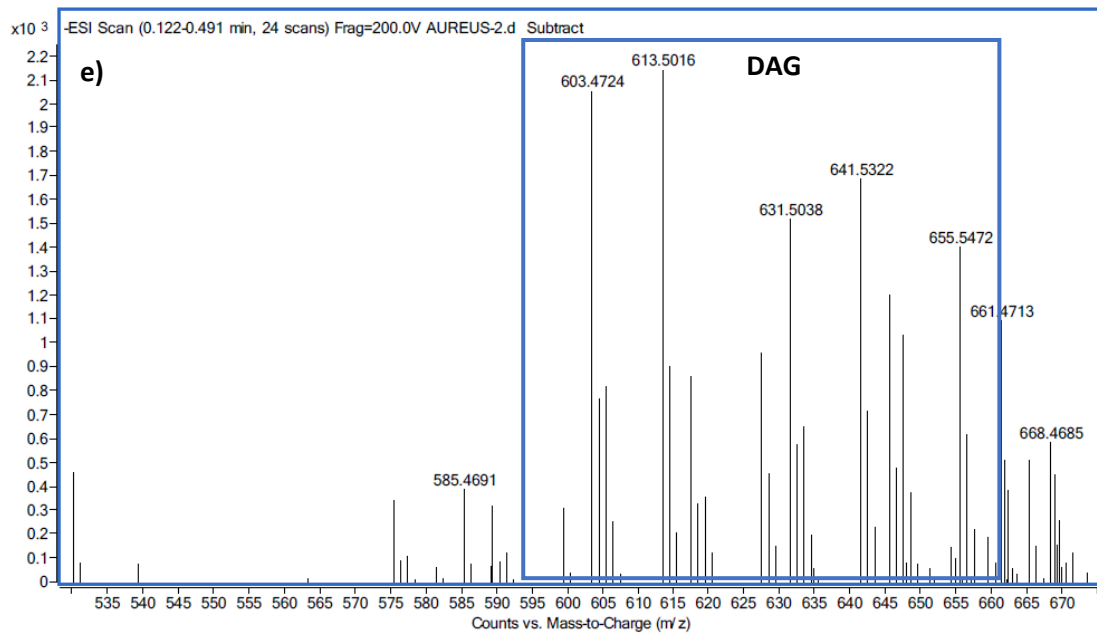
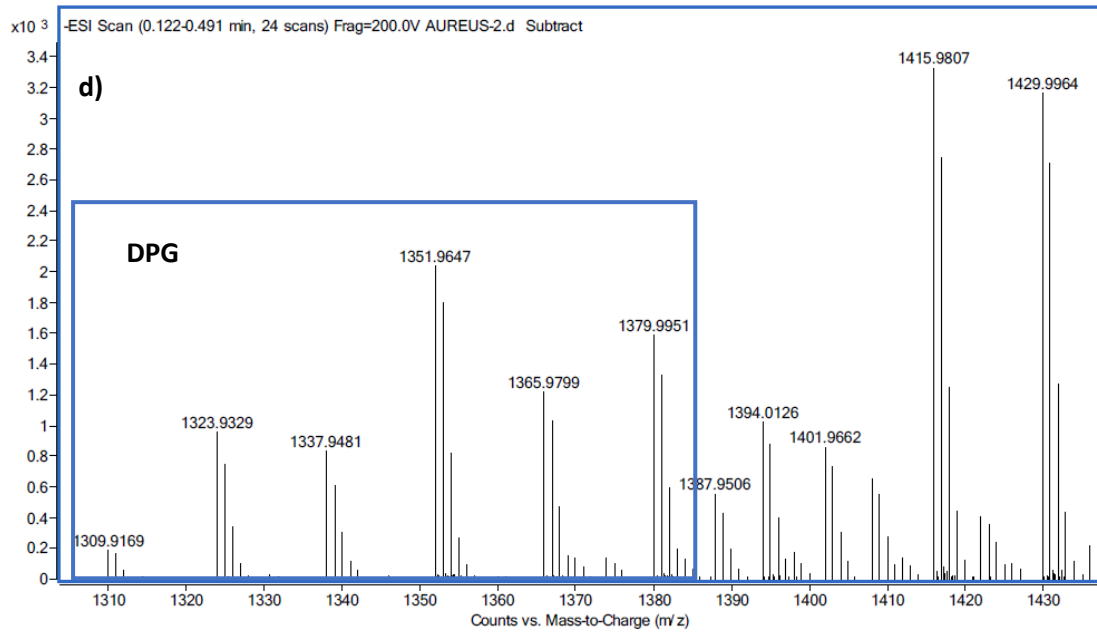
La espectrometría de masas en modo ESI-TOF reveló la existencia de PG, DPG, LPG y GL en todos los aislados estudiados, conjuntamente con AGL y DAG (Fig. 25a). Un detalle más completo para cada uno de estos compuestos se da en las Figs. 25b-25f.



RESULTADOS



RESULTADOS



RESULTADOS

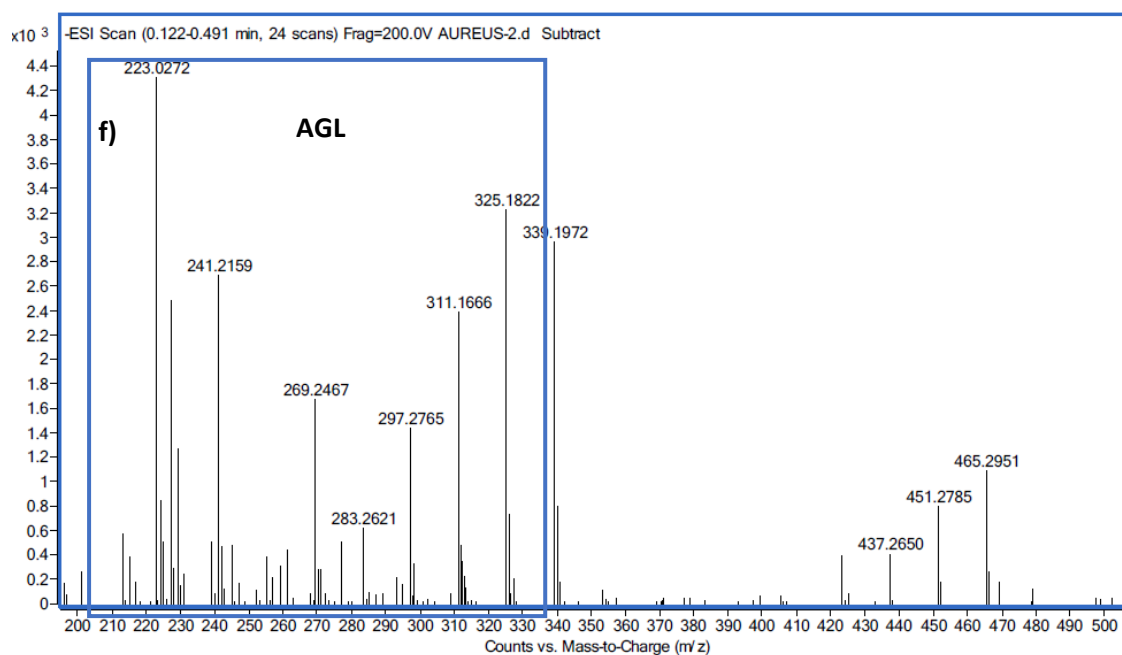


Figura 25. Ejemplos de espectros obtenidos por ESI-TOF-MS en la cepa SA2, donde se muestran: a) espectro general, b) PG, c) LPG y GL d) DPG, e) DAG, f) AGL.

Para la comparación de la composición lipídica de los cinco aislados de *S. aureus* se empleó como referencia SA1 (Fig. 26): como puede observarse, el contenido en PG fue muy similar en todos ellos, difiriendo, en general, en el resto de lípidos, por lo que puede afirmarse que cada uno de los aislados tiene una composición lipídica global específica. El mayor contenido en LPG se encontró en SA2, el único aislado resistente a daptomicina: las diferencias fueron estadísticamente significativas con el resto de aislados estudiados ($P = 0,006$). Además, se observó que en el aislado resistente el contenido del resto de lípidos fue menor que en SA1, siendo estadísticamente significativa la disminución de DPG en SA2 ($P = 0,047$). Las diferencias halladas en el resto de lípidos de SA2 no fueron estadísticamente significativas.

El aislado SA3 presentó un ligero aumento de LPG, aunque menor que el observado en SA2, y, en general, una disminución del resto de lípidos, resultado la disminución de DPG estadísticamente significativa ($P = 0,016$). El resto de las variaciones observadas en este aislado no fueron estadísticamente significativas.

RESULTADOS

En la composición lipídica de los aislados SA4 y SA5 se observó una disminución general de todos los lípidos estudiados, siendo estadísticamente significativa la disminución de DPG en SA4 ($P = 0,01$).

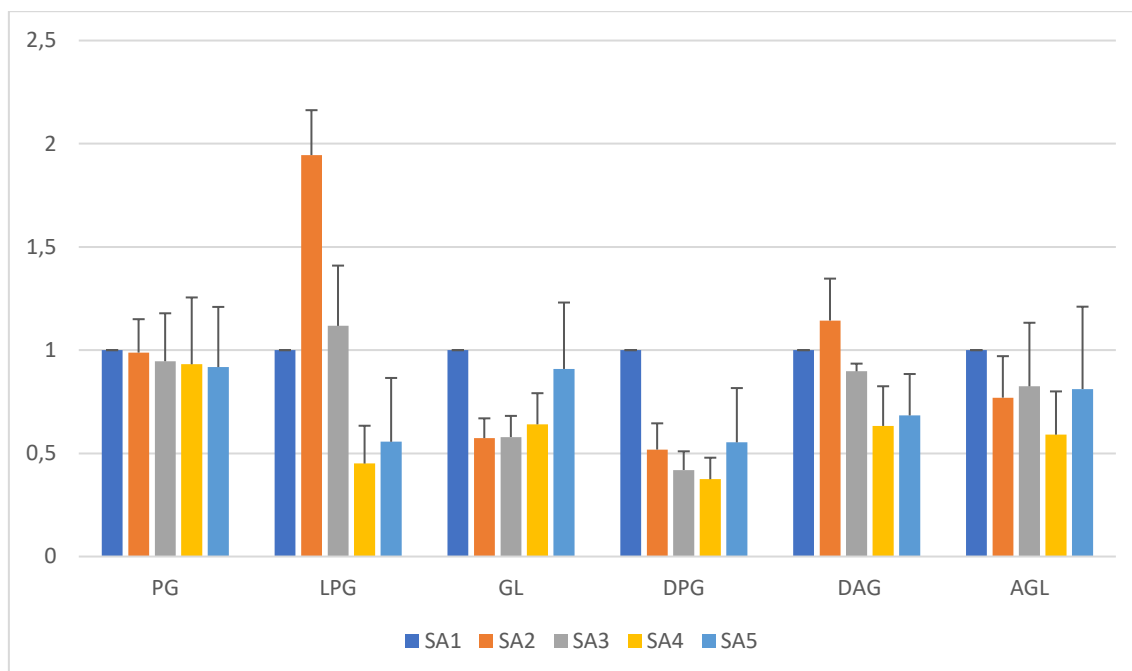


Figura 26. Comparación, relativa a SA1, de la composición de lípidos de los distintos aislados de *S. aureus* cultivados en MH agar 24h

2.2 GC-MS

La GC-MS demostró que los ácidos grasos de *S. aureus* variaron entre 14 y 21 carbonos, identificándose (Fig. 27) como ácidos iso-tetradecanoico (iso-C14), tetradecanoico (C14), iso-pentadecanoico (iso-C15), anteiso-pentadecanoico (ai-C15), iso-hexadecanoico (iso-C16), hexadecanoico (C16), iso-heptadecanoico (iso-C17), anteiso-heptadecanoico (ai-C17), heptadecanoico (C17), iso-octadecanoico (iso-C18), octadecanoico (C18), iso-nonadecanoico (iso-C19), anteiso-nonadecanoico (ai-C19), nonadecanoico (C19), iso-eicosanoico (iso-C20), eicosanoico (C20), iso-uneicosanoico (iso-C21), anteiso-uneicosanoico (ai-C21) y uneicosanoico. De estos, los ácidos grasos mayoritarios fueron ai-C15 y ai-C17.

RESULTADOS

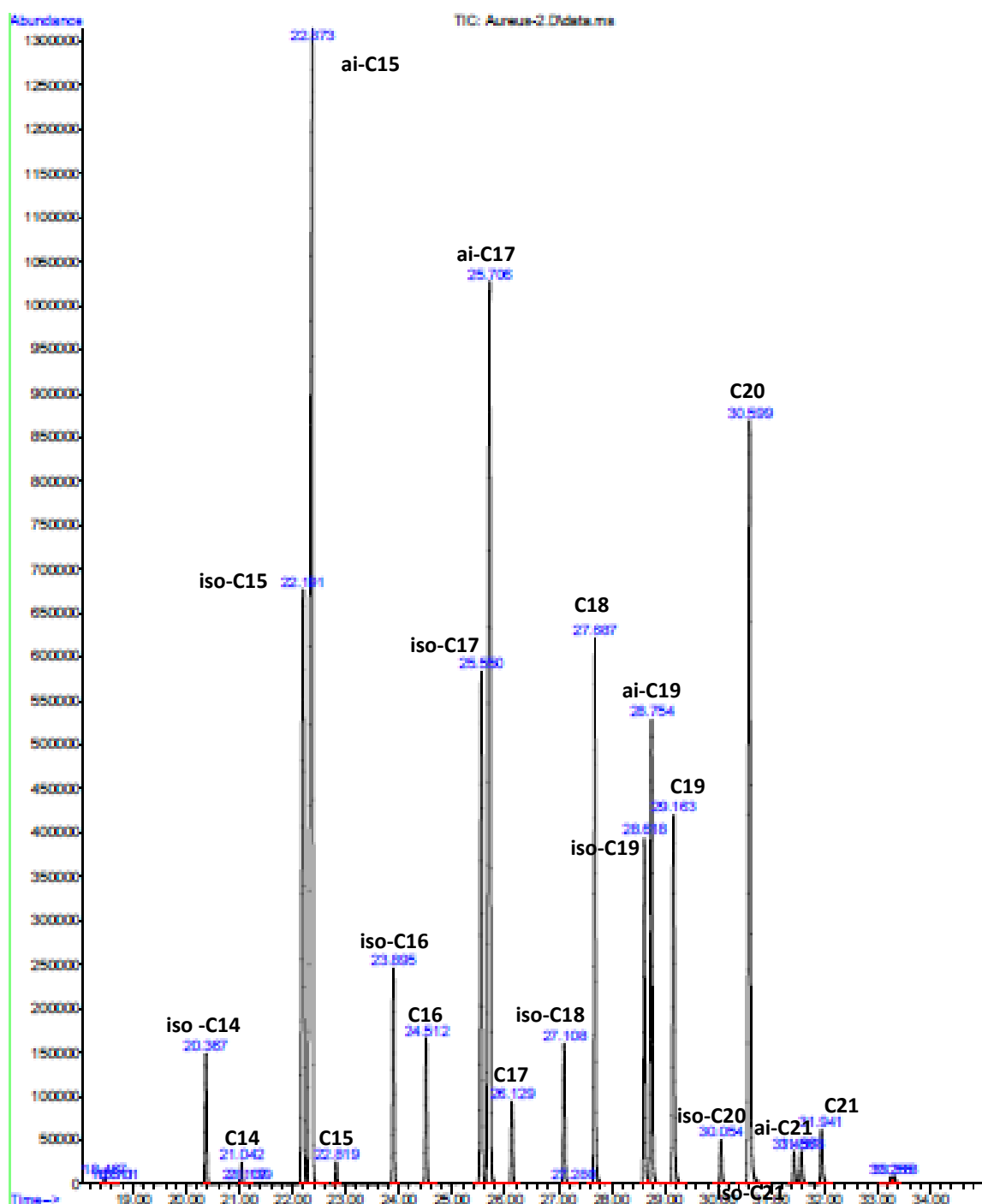


Figura 27. Ejemplo de cromatograma (ácidos grasos) obtenido mediante GC-MS del aislado SA2 en medio Mueller-Hinton agar.

Tal y como se refleja en la Tabla 14, la composición de los cinco aislados fue similar y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

RESULTADOS

Tabla 14. Composición (%) de ácidos grasos de los cinco aislados de *S. aureus* estudiados a las 24h de cultivo en medio sólido.

Ácido graso	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5
iso-C14	2,21 ± 0,42	1,91 ± 0,42	2,23 ± 0,16	2,11 ± 0,18	2,37 ± 0,23
C14	0,25 ± 0,06	0,29 ± 0,07	0,36 ± 0,06	0,27 ± 0,041	0,25 ± 0,02
iso-C15	9,66 ± 0,43	9,12 ± 0,49	9,86 ± 0,15	9,15 ± 0,36	9,70 ± 0,27
ai-C15	23,15 ± 0,27	23,62 ± 1,74	22,64 ± 0,60	23,25 ± 0,87	23,14 ± 0,18
C15	0,22 ± 0,02	0,31 ± 0,07	0,34 ± 0,06	0,48 ± 0,05	0,24 ± 0,02
iso-C16	3,42 ± 0,32	3,07 ± 0,49	3,37 ± 0,31	3,22 ± 0,50	3,55 ± 0,26
C16	1,79 ± 0,16	1,91 ± 0,22	2,19 ± 0,07	1,89 ± 0,13	1,76 ± 0,07
iso-C17	7,77 ± 0,22	7,18 ± 0,20	7,51 ± 0,15	7,03 ± 0,38	7,71 ± 0,22
ai-C17	13,88 ± 0,16	13,89 ± 0,26	13,57 ± 0,86	13,71 ± 1,71	14,13 ± 0,50
C17	1,33 ± 0,06	1,21 ± 0,23	1,47 ± 0,12	2,14 ± 0,07	1,33 ± 0,07
iso-C18	2,51 ± 0,17	2,16 ± 0,44	2,31 ± 0,17	2,11 ± 0,31	2,42 ± 0,16
C18	6,65 ± 0,26	6,79 ± 0,27	7,12 ± 0,39	6,49 ± 0,53	6,56 ± 0,16
iso-C19	5,42 ± 0,89	4,64 ± 0,22	4,55 ± 0,15	4,17 ± 0,14	4,59 ± 0,19
ai-C19	6,60 ± 0,20	6,51 ± 0,49	6,14 ± 0,39	5,68 ± 0,56	6,47 ± 0,34
C19	4,46 ± 0,59	4,82 ± 0,06	4,76 ± 0,43	6,51 ± 1,06	4,57 ± 0,13
iso-C20	0,92 ± 0,09	0,84 ± 0,26	0,87 ± 0,04	0,67 ± 0,06	0,91 ± 0,08
C20	7,81 ± 0,92	9,57 ± 1,74	8,63 ± 1,17	8,86 ± 1,81	8,23 ± 0,72
iso-C21	0,55 ± 0,05	0,56 ± 0,14	0,56 ± 0,06	0,45 ± 0,05	0,57 ± 0,09
ai-C21	0,67 ± 0,07	0,66 ± 0,20	0,60 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,64 ± 0,07
C21	0,72 ± 0,08	0,92 ± 0,17	0,90 ± 0,08	0,52 ± 0,41	0,87 ± 0,07

Además, el sumatorio general de las distintas especies de ácidos grasos encontradas en los aislados de *S. aureus* (Tabla 15) tampoco mostró diferencias significativas entre ellas. En general, para todos los aislados, los ácidos grasos anteiso-ramificados fueron los mayoritarios. Por otra parte, se aprecia que hay más ácidos grasos de cadena corta (C < 18 carbonos), que de cadena larga (C > 17 carbonos).

RESULTADOS

Tabla 15. Porcentaje de los diferentes tipos estructurales de ácidos grasos analizados en las cinco cepas de *S. aureus* estudiadas.

	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5
Σ ISO	32,46 ± 1,64	29,49 ± 2,5	31,26 ± 0,54	28,92 ± 0,74	31,81 ± 0,08
Σ ANTEISO	44,29 ± 0,06	44,69 ± 1,36	42,95 ± 1,85	43,14 ± 3,14	44,37 ± 0,78
Σ LINEALES	23,24 ± 1,61	25,83 ± 1,24	25,79 ± 2,34	27,93 ± 3,79	23,81 ± 0,82
Σ C. LARGA	36,32 ± 1,01	37,47 ± 0,46	36,45 ± 1,65	36,75 ± 3,05	35,81 ± 0,94

3 Influencia de daptomicina en la composición lipídica de *S. aureus*

3.1 ESI-TOF-MS

En las condiciones experimentalmente seguidas se demostró que la daptomicina no influye significativamente en la composición lipídica global de SA1 (Figs. 28a, 29a) ni de SA2 (Figs. 28b, 29b), tanto a las 4h de cultivo, como a las 24h de cultivo. En todos los casos las variaciones observadas fueron menores del 20%, resultando ser estadísticamente no significativas.

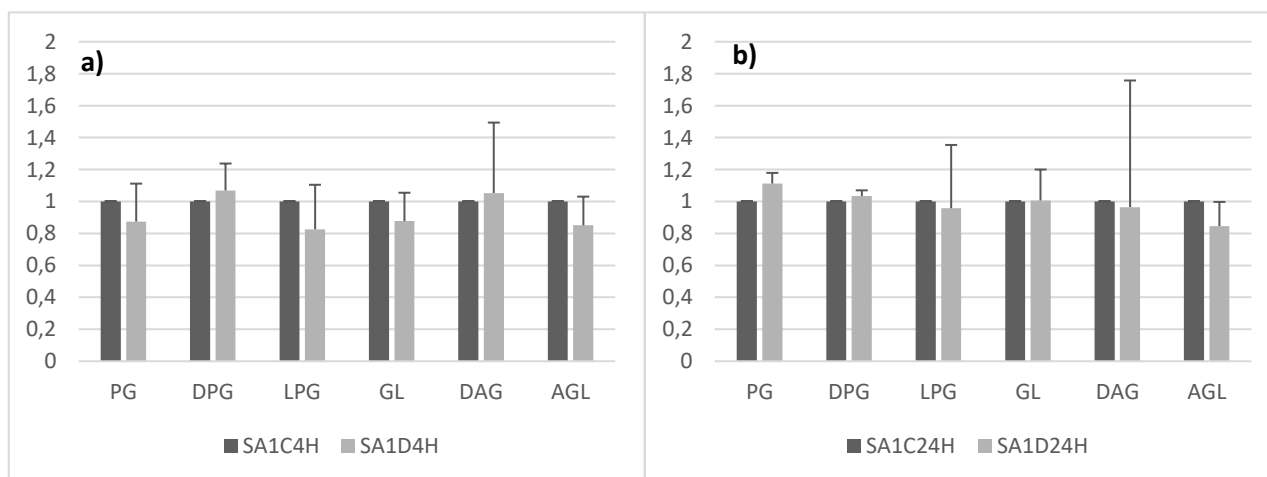


Figura 28. Composición lipídica de los aislados SA1 en medio líquido, en ausencia (control, C) y presencia de daptomicina (D). Para la comparación de cada uno de los lípidos se toman como referencia el control a las 4h (C4H) *versus* daptomicina 4h (D4H) y el control a las 24h (C24H) *versus* daptomicina 24H (D24H).

RESULTADOS

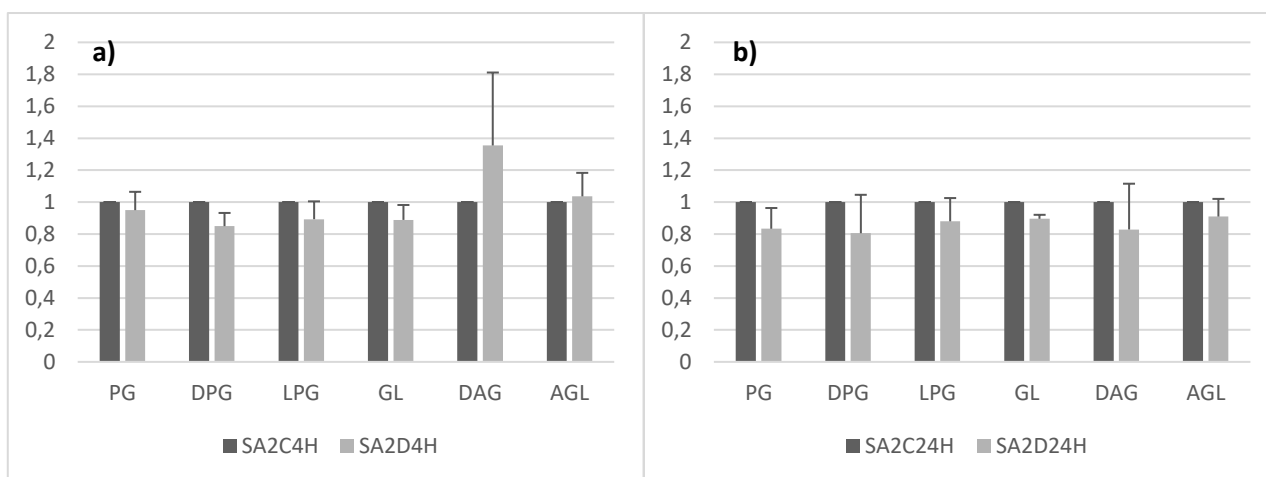


Figura 29. Composición lipídica de SA2 en medio líquido, en ausencia (control, C) y presencia de daptomicina (D). Para la comparación de cada uno de los lípidos se toman como referencia el control a las 4h (C4H) *versus* daptomicina 4h (D4H) y el control a las 24h (C24H) *versus* daptomicina 24h (D24H).

Adicionalmente, los datos revelaron que, al igual que en medio sólido, las composiciones lipídicas globales de ambos aislados son diferentes cuando se comparan a las 4h (Figs. 30a, 30b), y a las 24h (Figs. 31a, 31b), tanto en ausencia como en presencia de daptomicina.

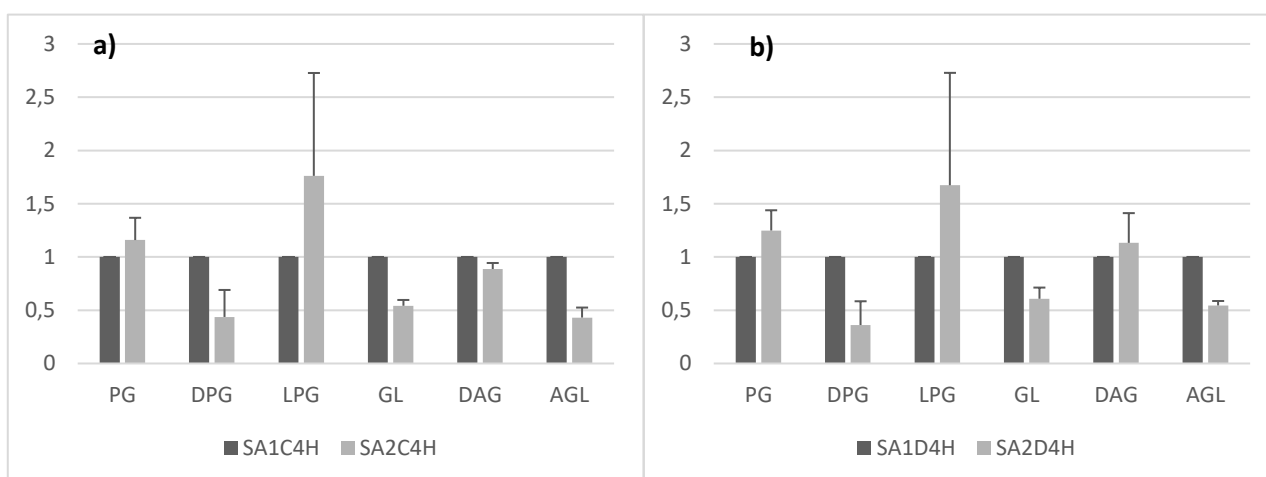


Figura 30. Composición lipídica de SA2 *versus* SA1 en medio Mueller-Hinton caldo a las 4h de cultivo: a) ausencia de daptomicina, b) presencia de daptomicina.

A las 4h de cultivo tanto en presencia como en ausencia de daptomicina, y usando como referencia SA1, se observó que el aislado SA2 contenía una mayor proporción de LPG, así como una menor cantidad del resto de lípidos estudiados. El

RESULTADOS

análisis estadístico reveló que, a las cuatro horas sin daptomicina, las diferencias observadas entre DPG, GL, DAG y AGL fueron estadísticamente significativas.

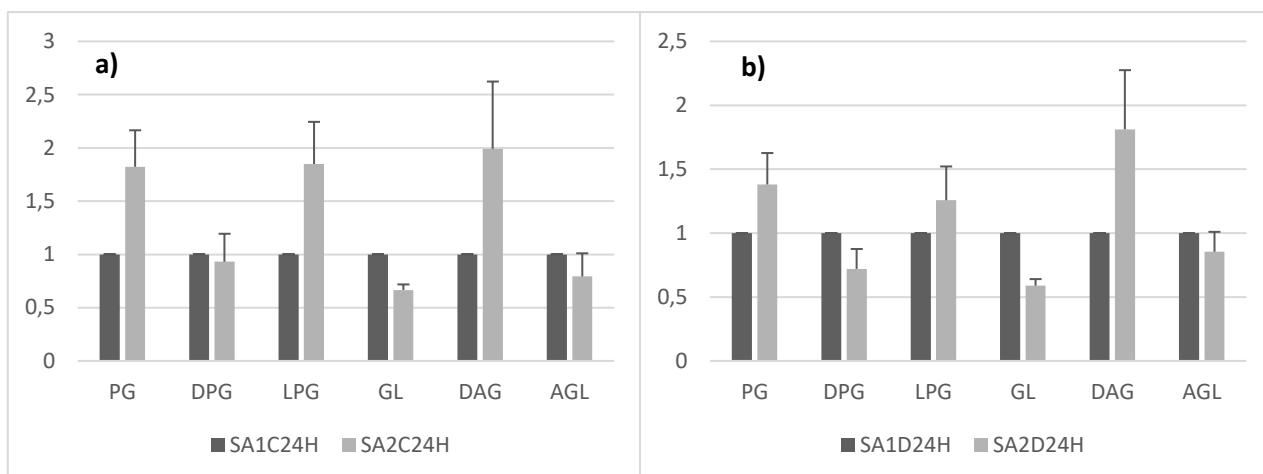


Figura 31. Composición lipídica de SA2 versus SA1 en medio Mueller-Hinton caldo a las 24h de cultivo: a) ausencia de daptomicina, b) presencia de daptomicina.

A las 24h de cultivo, tanto en ausencia como en presencia de daptomicina, se observó que SA2 presentó mayor proporción de PG, LPG y DAG, y una menor proporción de DPG, GL y AGL. El análisis estadístico señaló que las diferencias observadas en LPG y GL en ausencia de daptomicina fueron estadísticamente significativas, con $P = 0,021$ para LPG, y $P = 0$ para GL (Fig. 31a). Sin embargo, para el análisis realizado en presencia de daptomicina (Fig. 31b), las diferencias en los lípidos DPG, GL y DAG, fueron estadísticamente significativas con $P = 0,036$, $P = 0$ y $P = 0,039$, respectivamente.

3.2 GC-MS

El análisis de la composición de ácidos grasos en medio líquido realizado en SA1, tanto a las 4h de cultivo como a las 24h de cultivo, en ausencia y presencia de daptomicina, mostró que, al igual que en medio sólido, la longitud de la cadena de los ácidos grasos varió entre 14 y 21 carbonos, identificándose de forma idéntica a la anterior, siendo los ácidos grasos mayoritarios ai-C15 y ai-C17.

Con respecto a SA1, se observó que tanto en medio sólido como en medio líquido, e independientemente de la presencia/ausencia de daptomicina, la proporción de ácidos grasos se mantenía, por lo que daptomicina no tiene influencia sobre la longitud de la cadena de los ácidos grasos de este aislado (Tabla 16).

RESULTADOS

Tabla 16. Composición de ácidos grasos, expresada en porcentaje, del aislado SA1 en ausencia (control) y presencia de daptomicina, a 4h y 24h de cultivo.

Ácido graso	SA1C4H	SA1D4H	SA1C24H	SA1D24H
iso-C14	2,07 ± 0,61	1,93 ± 0,41	1,53 ± 0,93	1,62 ± 0,58
C14	0,49 ± 0,15	0,44 ± 0,07	0,35 ± 0,21	0,37 ± 0,14
iso-C15	10,17 ± 1,88	10,49 ± 2,08	8,99 ± 3,45	10,13 ± 2,42
ai-C15	19,03 ± 4,93	19,62 ± 5,20	16,96 ± 1,45	19,22 ± 2,42
C15	0,34 ± 0,16	0,29 ± 0,09	0,37 ± 0,22	0,32 ± 0,13
iso-C16	2,92 ± 0,13	2,93 ± 0,23	2,79 ± 0,39	2,98 ± 0,27
C16	8,39 ± 1,55	8,17 ± 1,49	6,27 ± 1,52	6,59 ± 1,85
iso-C17	6,61 ± 0,24	7,02 ± 0,66	7,32 ± 0,05	7,37 ± 0,58
ai-C17	11,41 ± 2,39	11,89 ± 2,46	13,35 ± 4,03	12,63 ± 2,91
C17	1,24 ± 0,35	1,28 ± 0,37	1,37 ± 0,35	1,37 ± 0,41
iso-C18	2,03 ± 0,40	2,11 ± 0,50	2,28 ± 0,31	2,29 ± 0,45
C18	10,16 ± 0,61	10,18 ± 0,70	10,56 ± 2,26	9,84 ± 1,10
iso-C19	3,97 ± 0,73	4,01 ± 0,89	4,50 ± 0,34	4,17 ± 0,81
ai-C19	5,14 ± 0,19	5,07 ± 0,04	6,22 ± 0,78	5,48 ± 0,19
C19	4,36 ± 1,38	4,16 ± 1,21	4,90 ± 1,06	4,49 ± 1,29
iso-C20	1,06 ± 0,48	0,96 ± 0,46	1,13 ± 0,45	1,02 ± 0,46
C20	8,09 ± 2,17	7,32 ± 1,73	8,52 ± 1,09	7,79 ± 1,78
iso-C21	0,72 ± 0,38	0,67 ± 0,38	0,76 ± 0,38	0,70 ± 0,39
ai-C21	0,69 ± 0,31	0,59 ± 0,27	0,75 ± 0,31	0,63 ± 0,28
C21	1,11 ± 0,66	0,84 ± 0,47	1,05 ± 0,59	0,98 ± 0,57

Además, la proporción global de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos obtenida en este aislado también se mantuvo en todas las condiciones descritas anteriormente, y, al igual que en medio sólido, se observó (Tabla 17) que los ácidos grasos mayoritarios fueron los anteiso ramificados. Sin embargo, en medio líquido se observó un aumento en la cantidad total de ácidos grasos lineales, similar en todas las condiciones estudiadas.

RESULTADOS

Tabla 17. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de SA1 en ausencia (C) y presencia de daptomicina (D), a 4h y 24h.

	SA1C4H	SA1D4H	SA1C24H	SA1D24H
Σ ISO	29,55 ± 4,41	30,15 ± 5,61	29,32 ± 6,23	30,29 ± 5,89
Σ ANTEISO	36,27 ± 7,00	37,16 ± 7,38	37,28 ± 5,94	37,95 ± 7,28
Σ LINEALES	34,18 ± 2,72	32,69 ± 1,80	33,39 ± 0,44	31,76 ± 1,47
Σ C. LARGA	37,33 ± 7,43	35,92 ± 6,41	40,68 ± 1,79	37,39 ± 5,98

Tabla 18. Composición de ácidos grasos, expresada en porcentaje, de SA2 en ausencia (control) y presencia de daptomicina, a 4h y 24h de cultivo.

Ácido graso	SA2C4H	SA2D4H	SA2C24H	SA2D24H
iso-C14	1,53 ± 0,29	1,15 ± 0,73	1,39 ± 0,31	1,54 ± 0,21
C14	0,53 ± 0,13	0,41 ± 0,26	0,45 ± 0,13	0,50 ± 0,09
iso-C15	7,18 ± 2,99	6,58 ± 3,58	6,82 ± 2,71	10,38 ± 1,72
ai-C15	22,76 ± 4,54	18,88 ± 2,76	22,81 ± 3,59	20,29 ± 4,97
C15	0,34 ± 0,08	0,30 ± 0,14	0,37 ± 0,10	0,38 ± 0,09
iso-C16	2,79 ± 0,22	2,69 ± 0,44	2,86 ± 0,20	2,94 ± 0,25
C16	9,13 ± 0,57	8,68 ± 0,12	6,56 ± 1,27	6,94 ± 1,36
iso-C17	6,71 ± 0,55	7,27 ± 0,24	6,94 ± 0,35	7,56 ± 1,02
ai-C17	12,67 ± 1,97	13,85 ± 2,84	13,58 ± 1,84	13,27 ± 1,29
C17	1,19 ± 0,23	1,19 ± 0,20	1,24 ± 0,32	1,21 ± 0,32
iso-C18	1,87 ± 0,43	2,06 ± 0,19	2,01 ± 0,41	2,00 ± 0,47
C18	10,32 ± 0,29	11,17 ± 1,63	9,53 ± 0,69	9,34 ± 0,42
iso-C19	3,72 ± 0,67	4,45 ± 0,27	4,00 ± 0,66	4,00 ± 0,82
ai-C19	5,51 ± 0,34	6,39 ± 1,12	6,06 ± 0,42	5,72 ± 0,52
C19	3,79 ± 0,80	4,09 ± 0,06	4,20 ± 1,07	3,82 ± 0,99
iso-C20	0,79 ± 0,36	0,82 ± 0,22	0,89 ± 0,39	0,79 ± 0,32
C20	7,27 ± 0,83	8,07 ± 0,86	8,06 ± 1,23	7,47 ± 0,62
iso-C21	0,56 ± 0,31	0,58 ± 0,21	0,62 ± 0,32	0,54 ± 0,25
ai-C21	0,63 ± 0,29	0,65 ± 0,17	0,75 ± 0,35	0,62 ± 0,25
C21	0,71 ± 0,38	0,70 ± 0,25	0,84 ± 0,48	0,67 ± 0,33

RESULTADOS

En SA2 también se observaron en las distintas condiciones de cultivo (Tabla 18), ácidos grasos iso-ramificados, anteiso-ramificados y lineales, con una longitud de cadena que varió desde los 14 hasta los 21 carbonos, los mismos mencionados anteriormente. Los ácidos grasos mayoritarios fueron el anteiso-pentadecanoico, anteiso - C15, y el ácido graso anteiso heptadecanoico, anteiso - C17.

Tanto a las 4h de cultivo, como a las 24h, en ausencia y presencia de daptomicina, el porcentaje de los distintos ácidos grasos fue el mismo y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La proporción general de los distintos tipos de ácidos grasos observada en las diferentes condiciones de cultivo (Tabla 19) se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas. Al igual que en medio sólido, se apreció un mayor contenido de ácidos grasos anteiso ramificados, sin embargo, al igual que en SA1, se aprecia un mayor contenido de ácidos grasos lineales que el observado en el cultivo en medio sólido.

Tabla 19. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de SA2 en ausencia (C) y presencia de daptomicina (D), a 4h y 24h.

	SA2C4H	SA2D4H	SA2C24H	SA2D24H
Σ ISO	25,15 ± 3,48	25,59 ± 4,85	25,54 ± 3,34	29,78 ± 4,84
Σ ANTEISO	41,58 ± 5,90	39,78 ± 3,31	43,19 ± 4,40	39,89 ± 5,49
Σ LINEALES	33,27 ± 2,95	34,62 ± 1,69	31,27 ± 1,36	30,33 ± 0,66
Σ C. LARGA	36,50 ± 7,08	39,74 ± 3,48	37,61 ± 6,20	36,36 ± 6,58

4 Estudio del grosor de la envoltura celular de SA1 y SA2

La microscopía electrónica de transmisión reveló un grosor de pared de 37,21 ± 4,28 nm en la cepa SA1 (Fig. 32a), y de 40,08 ± 4 nm en el aislado SA2 (Fig. 32b). La diferencia resultó no ser estadísticamente significativa.

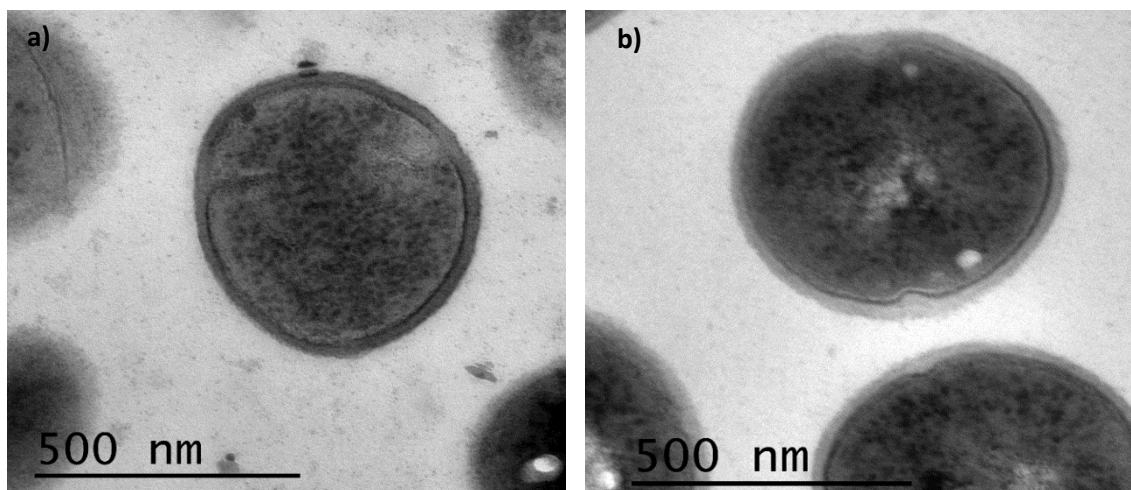


Figura 32. Microscopía electrónica de transmisión de: a) SA1 y b) SA2.

5 Secuenciación del cromosoma de *S. aureus* y análisis bioinformático

Los cromosomas de SA1, y SA2 presentaron un total de 2.8 Mpb, equivalentes a 2648 genes que correspondían con 2572 CDS, 63 ARNt, 12 ARNr y 1 ARNm.

En la tabla 20 se muestran las mutaciones observadas, que se establecieron como cambios en el genoma del aislado SA2 (resistente a daptomicina), con respecto a SA1 (sensible a daptomicina).

Con estos criterios se observaron mutaciones en los genes *purR*, *mprF*, *ebhb_1* y en un gen de función desconocida (Tabla 20).

Tras esto, se comprobó, mediante PCR, si las mutaciones observadas en la secuenciación de los cromosomas se confirmaban mediante secuenciación de Sanger, de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 7 de materiales y métodos. Con esta técnica pudimos confirmar que todas las mutaciones observadas en la secuenciación del cromosoma se encontraban presentes.

RESULTADOS

Tabla 20. Mutaciones encontradas en la secuenciación del cromosoma de SA2 con respecto a SA1.

Gen	Cambio de nucleótidos	Función proteica	Cambio de aminoácidos
<i>purR</i>	CT87C	Regulador de transcripción asociado al metabolismo de purinas	Delección del aminoácido Phe en la posición 29 de la cadena proteica
<i>mprF</i>	C941T	Enzima responsable de la síntesis de LPG y su translocación a la parte externa de la membrana	Pro314Leu
<i>ebhb_1</i>	G10056A	Adhesina emb	Ala3352Ala
<i>Desconocido</i>	Delección	Proteína hipotética	LeuGlnMetLeuSerTyrLeuAsnAsnHisGlnTrpLeuLeuLysGlyArgAspGlnArgAspGlnArgLys69Gln

*Staphylococcus capitis*1 Sensibilidad antibiótica

Los cuatro aislados de *S. capitis* estudiados (SC32, SC33, SC34 y SC35), presentaron el mismo perfil de resistencia a los antibióticos testados mediante el sistema Vitek 2®, a excepción de la daptomicina (Tabla 21).

Tabla 21. Antibiograma (Vitek2®) de las diferentes cepas de *S. capitis*, e interpretación de los resultados (S: sensible y R: resistente). La concentración se expresa en µg/mL. Se destaca en negrita la CMI obtenida para el antibiótico daptomicina en todos los aislados.

Antibióticos	SC32	SC33	SC34	SC35
Bencilpenicilina	≥0,5 (R)	≥0,5 (R)	≥0,5 (R)	≥0,5 (R)
Oxacilina	≥4 (R)	≥4 (R)	≥4 (R)	≥4 (R)
Gentamicina	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)
Tobramicina	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)
Levofloxacino	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)
Clindamicina	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)
Eritromicina	≥8 (R)	≥8 (R)	≥8 (R)	≥8 (R)
Linezolid	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)
Daptomicina	0,75 (S)	2 (R)	2 (R)	4 (R)
Vancomicina	1 (S)	1 (S)	1 (S)	1 (S)
Teicoplanina	1 (S)	≤0,5 (S)	1 (S)	≤0,5 (S)
Tigeciclina	≤0,12 (S)	≤0,12 (S)	≤0,12 (S)	≤0,12 (S)
Fosfomicina	≥128 (R)	≥128 (R)	≥128 (R)	≥128 (R)
Ácido fusídico	≥32 (R)	≥32 (R)	≥32 (R)	≥32 (R)
Rifampicina	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)
Trimetoprima/ sulfametoxazol	≤10 (S)	≤10 (S)	≤10 (S)	≤10 (S)

El aislado SC32 se consideró, de acuerdo con los criterios establecidos por el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019), sensible a daptomicina. Los aislados SC33 y SC34 presentaron una CMI de 2 µg/mL y la de SC35 fue de 4 µg/mL, por lo que se catalogaron como resistentes a daptomicina.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos mediante Vitek 2[®] se contrastaron con las tiras de E-test[®] (Tabla 22). Con este método (Fig. 33) se obtuvieron CMI's más bajas a daptomicina aunque, excepto para el aislado SC33, coincidieron en las categorías clínicas de sensible o resistente, de acuerdo con los criterios del EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019).

Tabla 22. Comparación entre los resultados obtenidos mediante los métodos Vitek[®] y E-test[®] en los aislados de *S. capitis*. La concentración se expresa en µg/mL.

	E-test [®] daptomicina	Vitek [®] daptomicina
SC32	0,5	0,75
SC33	1	2
SC34	1.5	2
SC35	1.5	4

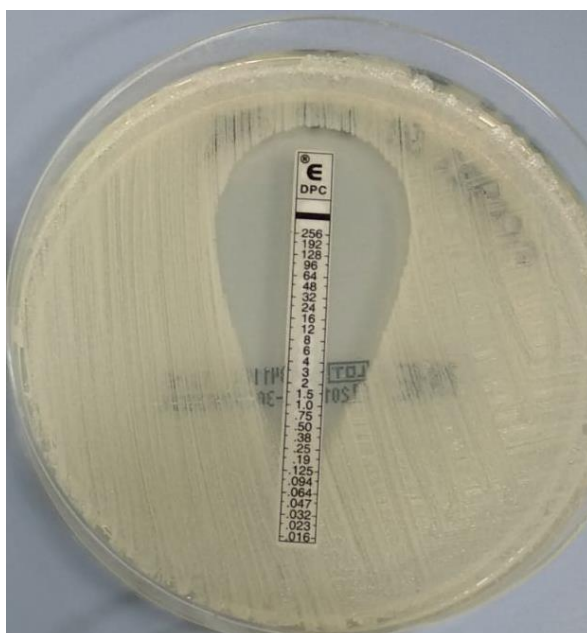


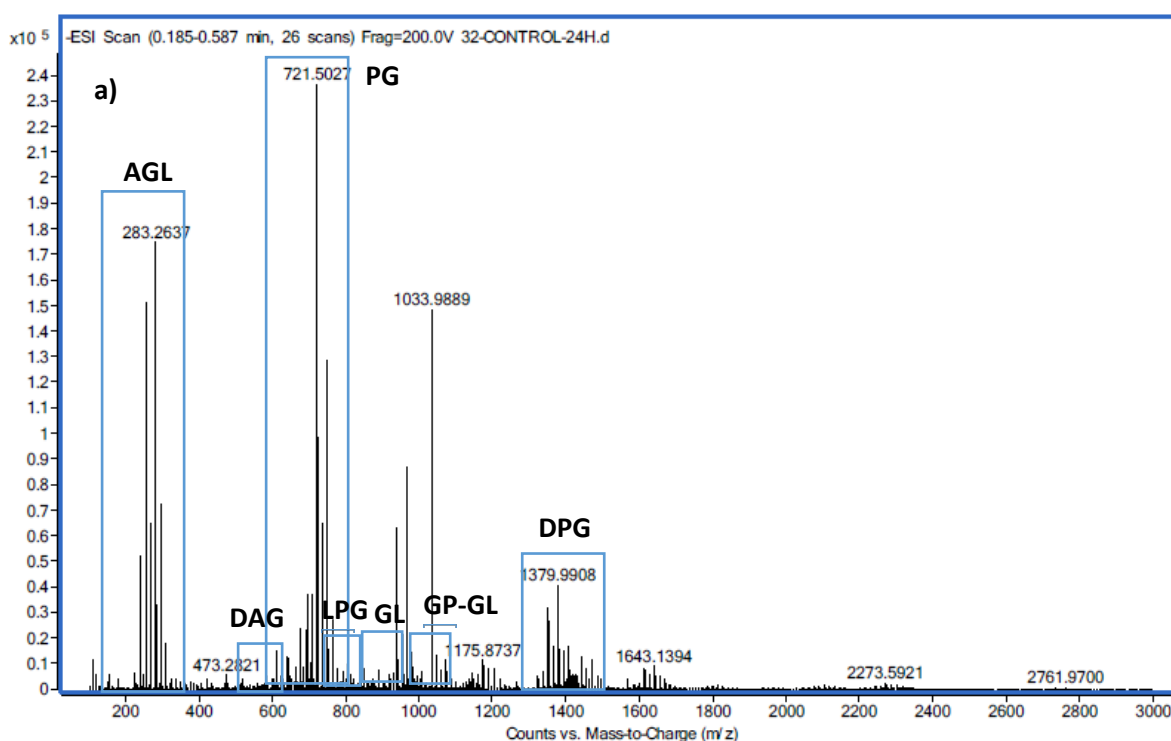
Figura 33. Ejemplo de E-test[®] a daptomicina realizado al aislado SC32.

RESULTADOS

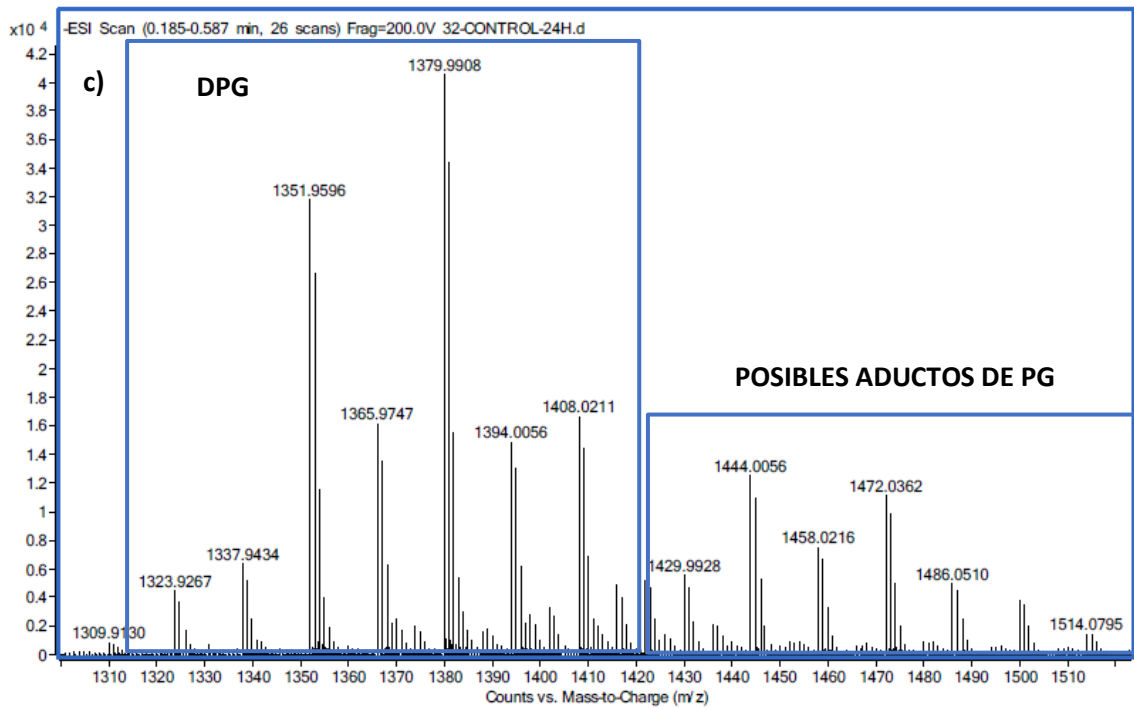
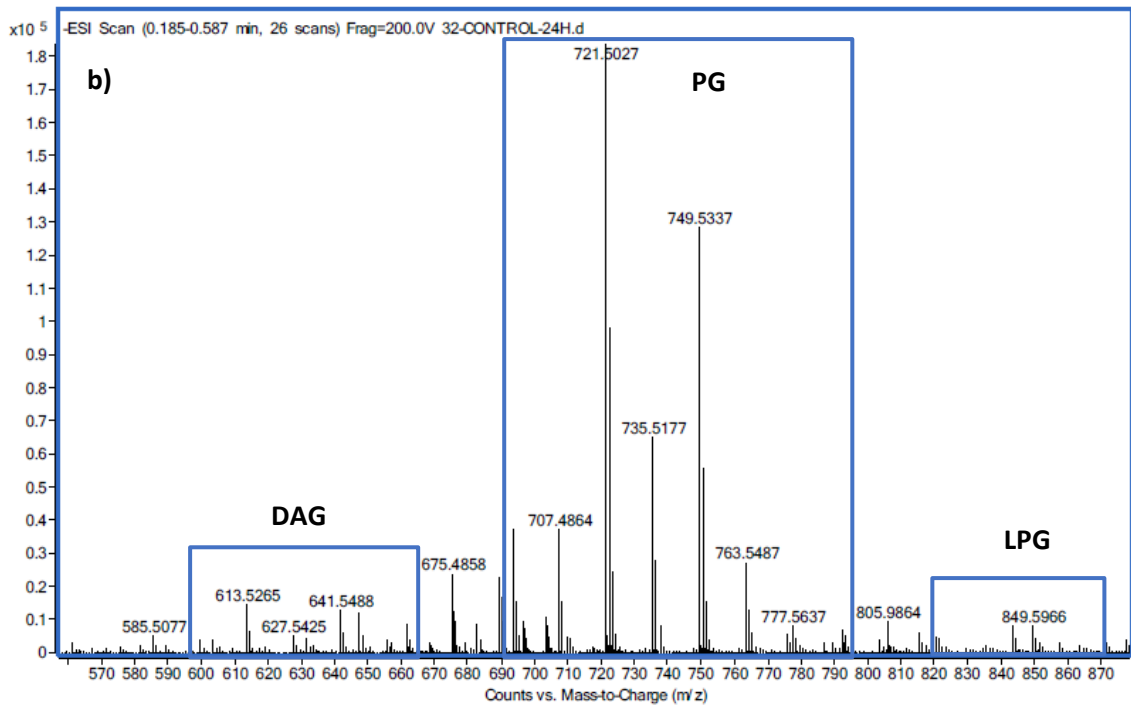
2 Composición general de lípidos en los cuatro aislados de *Staphylococcus capitis* (24h MH agar)

2.1 ESI-TOF-MS

La espectrometría de masas en modo ESI-TOF demostró la existencia de PG, DPG, LPG y GL en todos los aislados estudiados, conjuntamente con AGL, DAG y GP-GL (Fig. 34a). También se observaron señales entre m/z 1429 y 1640, que podrían corresponder a aductos de PG (no confirmado). Un detalle más completo para cada uno de estos compuestos se da en las Figs. 34b-34f.



RESULTADOS



RESULTADOS

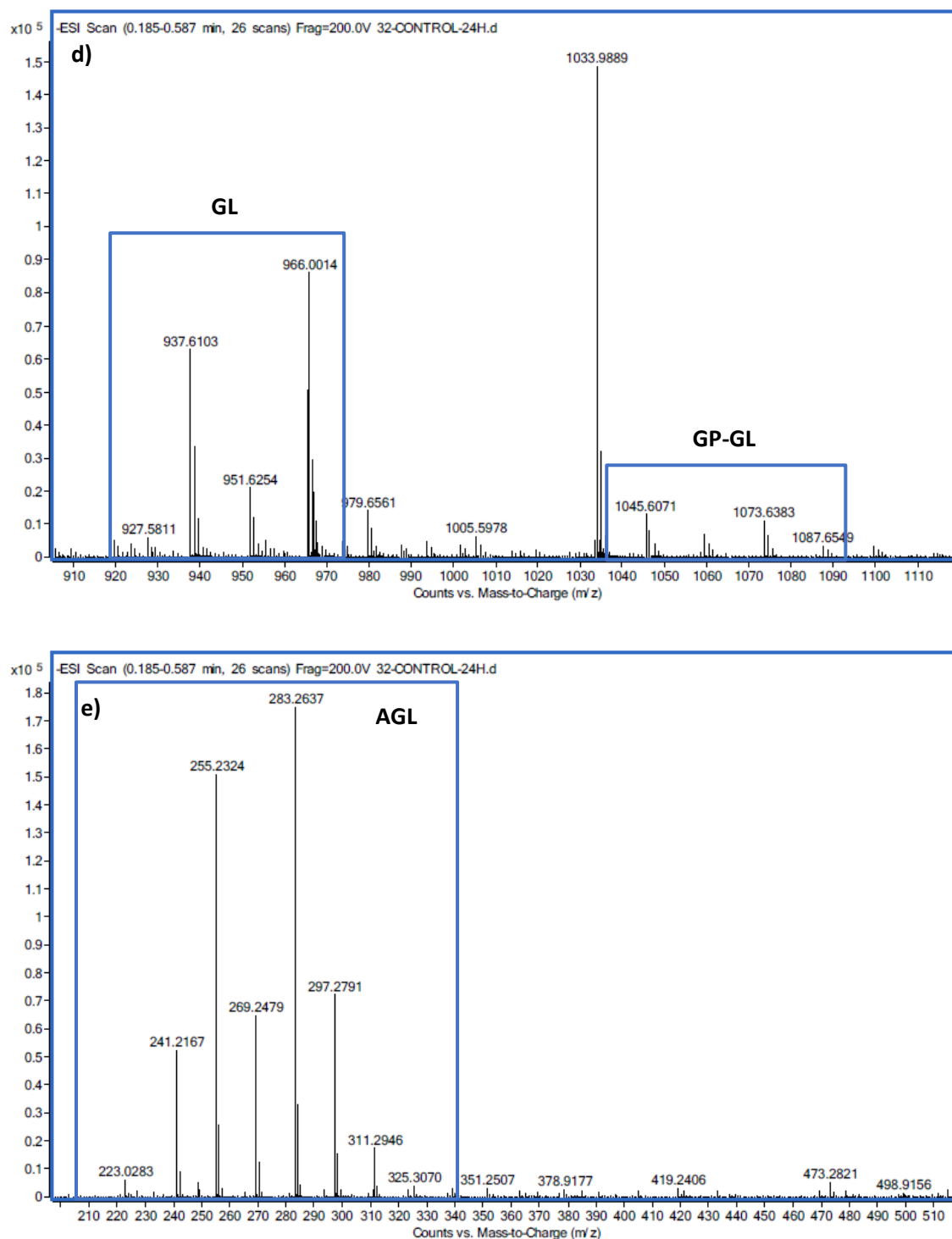


Figura 34. Ejemplos de espectros obtenidos por ESI-TOF-MS en la cepa SC32, donde se muestran: a) espectro general, b) GL, PG y LPG, c) DPG, d) GL y GP-GL, e) AGL.

Para la comparación de la composición lipídica de los cuatro aislados de *S. capitis* se empleó como referencia SC32 (Fig. 35): como puede observarse, el contenido en PG fue muy similar en todos ellos, difiriendo, en general, en el resto de lípidos, por lo que

RESULTADOS

puede afirmarse que cada uno de los aislados tiene una composición lipídica global específica.

En general, todos los aislados presentaron menor abundancia en DPG, LPG, GL Y GP-GL, y mayor en DAG y AGL (especialmente en SC35). El análisis estadístico reveló que las diferencias en el contenido de LPG, GL, GP-GL y AGL fueron significativas en todos los aislados ($p < 0,005$).

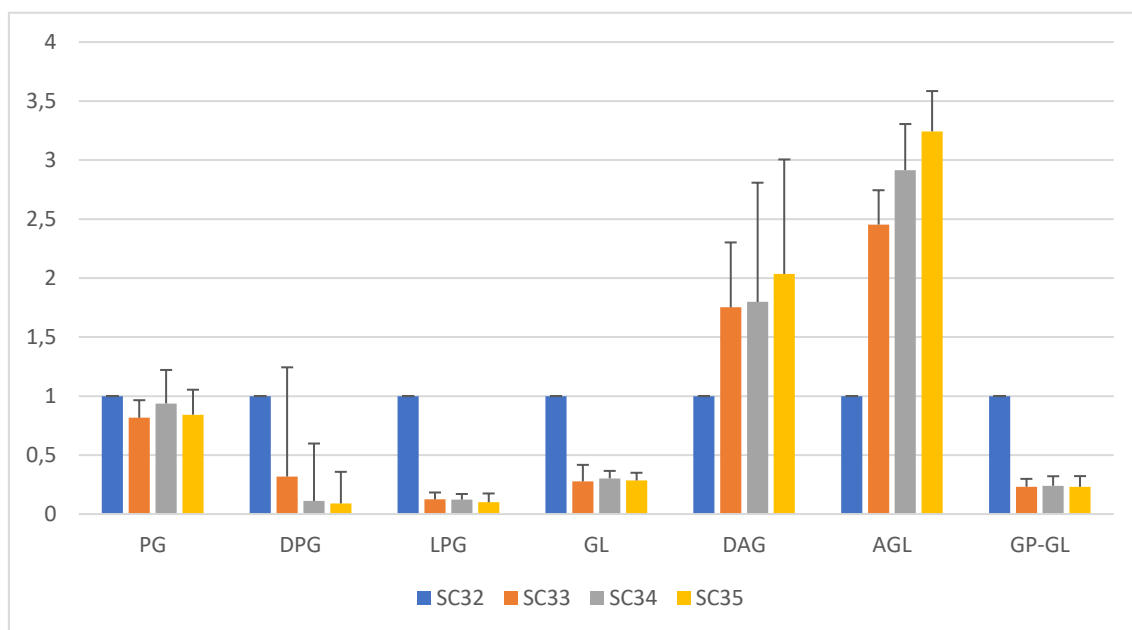


Figura 35. Comparación de la composición de lípidos de los aislados SC33, SC34 y SC35 con respecto al control SC32.

2.2 Distribución de los grupos acilo entre los distintos lípidos de membrana

Para estudiar cómo se distribuyen los grupos acilos de los diferentes lípidos estudiados mediante ESI-TOF-MS, se compararon las especies moleculares que poseen una combinación de ácidos grasos de 15 y 17 carbonos con las especies moleculares que poseían una combinación de ácidos grasos de 15 y 19 carbonos, indicadas en las Tablas 3-9 en el apartado 2.2 de materiales y métodos.

La espectrometría de masas en modo ESI-TOF, indicó, sorprendentemente, que los grupos acilo de los distintos lípidos de membrana se distribuyeron de manera desigual, siguiendo el mismo patrón en todos los aislados (Fig. 36), tendiendo a acumularse los de longitud más corta en PG, LPG, GL, GP-GL y AGL, mientras que en DPG

RESULTADOS

y DAG lo hacían los de longitud más larga. El análisis estadístico reveló que estos resultados solo fueron significativos para el LPG ($P = 0,012$); es decir, el LPG de las cepas resistentes a daptomicina (SC33, SC34 y SC35) tienden a tener grupos acilo más largos que la cepa sensible (SC32).

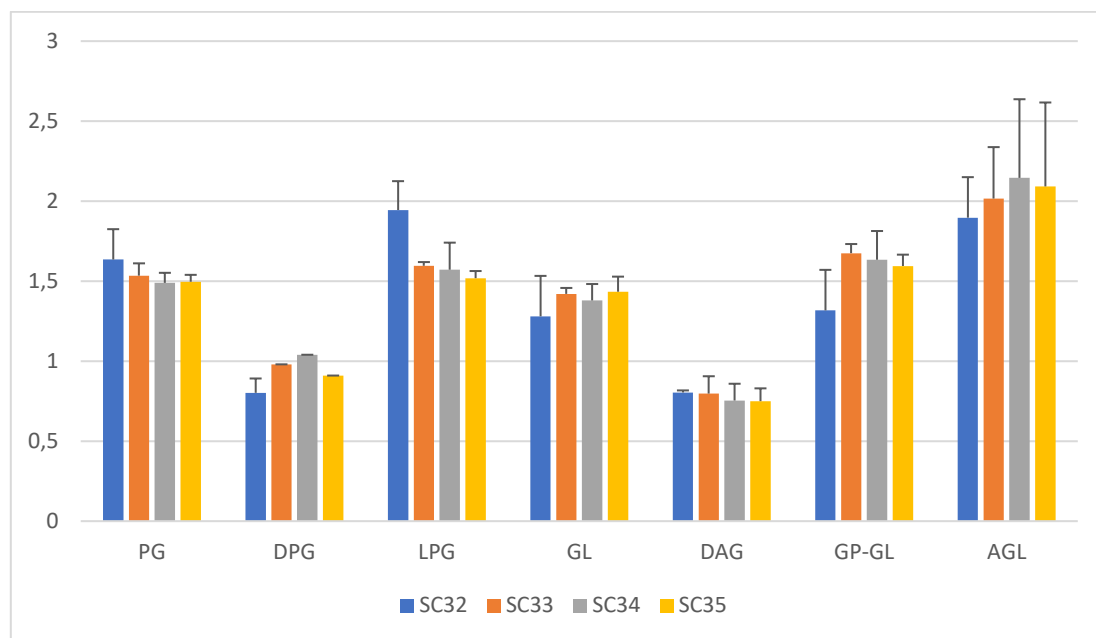


Figura 36. Relación entre las intensidades de las especies moleculares mayoritarias de los lípidos de los distintos aislados de *S. capitatus* en medio MH agar a las 24h de cultivo.

2.3 GC-MS

La GC-MS demostró que los ácidos grasos de *S. capitatus*, al igual que los de *S. aureus* variaron entre 14 y 21 carbonos (Fig. 37).

Todos los aislados presentaron como ácido graso mayoritario el ai-C15, sin embargo, SC32 presentó como segundo ácido graso mayoritario ai-C17, mientras que para los aislados SC33, SC34 y SC35 fue el iso-C19 (Tabla 23). También se encontraron variaciones en el porcentaje de otros ácidos grasos entre SC32 y el resto de aislados.

Así, los ácidos grasos iso-C14, iso-C16, ai-C17, C17, iso-C18 e iso-C20, son más abundantes en SC32 que en el resto de aislados estudiados.

RESULTADOS

Por otra parte, los ácidos grasos C14, iso-C19, iso-C21 y ai-C21 presentaban una mayor concentración en los aislados SC33, SC34 y SC35 que en el aislado SC32.

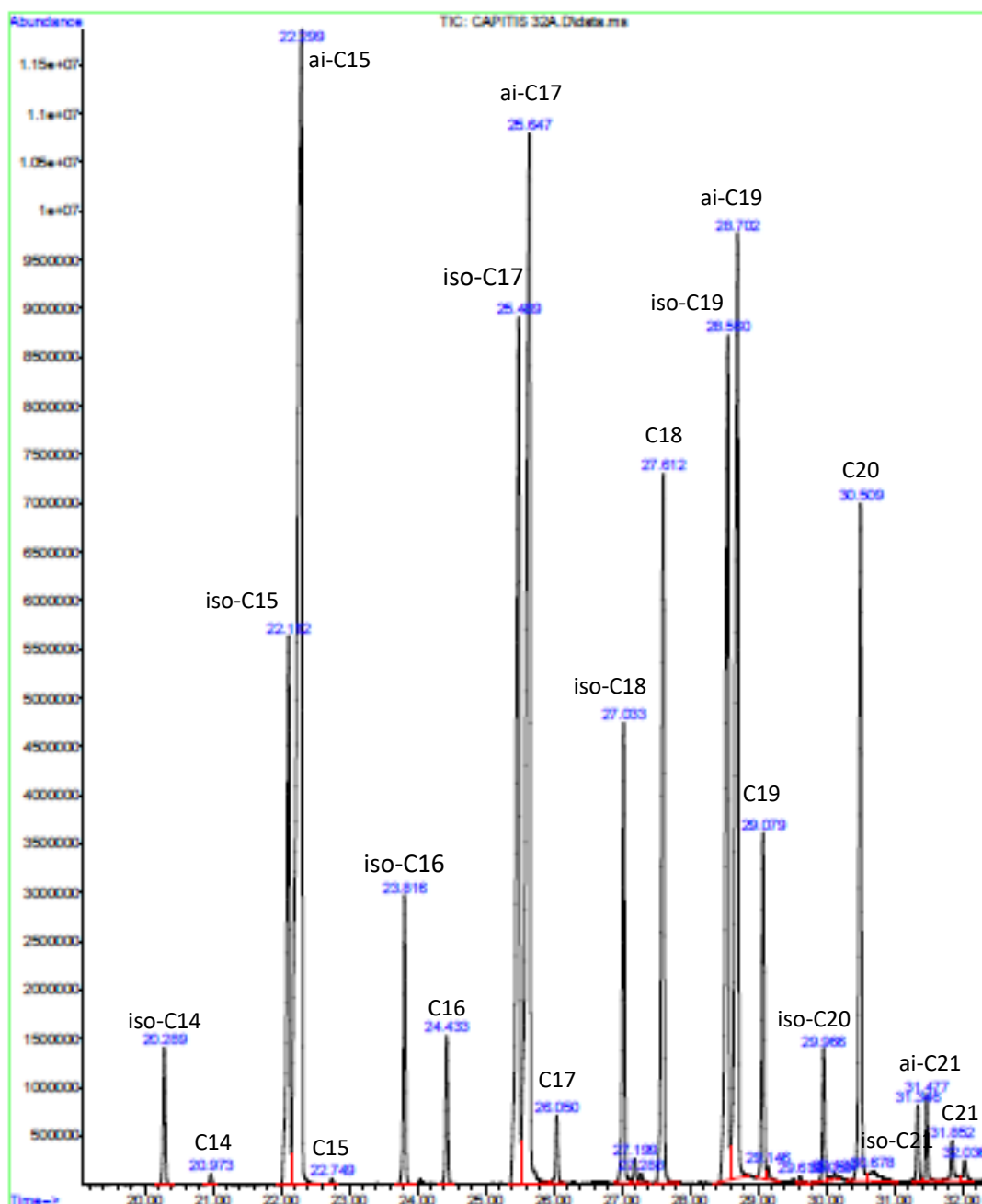


Figura 37. Ejemplo de cromatograma obtenido mediante GC-MS del aislado SC32.

El sumatorio de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos (Tabla 24) reveló que las diferencias observadas en los distintos ácidos grasos no tenían relevancia en la composición general, ya que todos los aislados presentaron el mismo patrón de ácidos grasos, en el que los ácidos grasos anteiso-ramificados fueron los mayoritarios.

RESULTADOS

También se observó que los ácidos grasos considerados de cadena larga ($C > 17$), que suponen entorno a un 35-38% del total de ácidos grasos, tienen menor concentración que los ácidos grasos de cadena corta ($C < 18$).

Tabla 23. Composición (%) de ácidos grasos de los cuatro aislados de *S. capitis* estudiados.

Ácido graso	SC32	SC33	SC34	SC35
iso-C14	1,14 ± 0,19	0,38 ± 0,13	0,36 ± 0,004	0,29 ± 0,14
C14	0,08 ± 0,02	0,21 ± 0,12	0,13 ± 0,06	0,11 ± 0,05
iso-C15	6,58 ± 1,36	5,96 ± 1,58	6,05 ± 0,78	5,58 ± 1,55
ai-C15	21,94 ± 2,72	20,13 ± 3,74	21,06 ± 2,12	19,87 ± 5,35
C15	0,05 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02
iso-C16	2,23 ± 0,22	0,56 ± 0,17	0,53 ± 0,11	0,48 ± 0,04
C16	1,03 ± 0,14	1,75 ± 0,67	1,07 ± 0,23	1,35 ± 0,56
iso-C17	10,76 ± 0,82	11,52 ± 1,21	11,54 ± 1,61	11,31 ± 0,94
ai-C17	15,92 ± 0,88	13,28 ± 1,01	13,41 ± 1,45	13,07 ± 0,99
C17	0,46 ± 0,09	0,27 ± 0,03	0,20 ± 0,05	0,18 ± 0,06
iso-C18	3,39 ± 0,64	1,35 ± 0,06	1,36 ± 0,22	1,31 ± 0,22
C18	6,26 ± 0,39	5,63 ± 0,49	5,02 ± 0,44	5,56 ± 0,89
iso-C19	9,49 ± 1,19	15,46 ± 1,80	15,47 ± 1,42	16,02 ± 2,26
ai-C19	11,06 ± 1,02	13,19 ± 0,71	13,52 ± 0,53	13,77 ± 0,77
C19	2,20 ± 0,66	1,71 ± 0,32	1,74 ± 0,26	1,88 ± 0,36
iso-C20	0,77 ± 0,48	0,43 ± 0,25	0,46 ± 0,23	0,48 ± 0,29
C20	5,44 ± 1,26	5,44 ± 1,17	5,54 ± 0,78	5,84 ± 1,25
iso-C21	0,68 ± 0,051	1,99 ± 0,11	1,88 ± 0,26	2,19 ± 0,65
ai-C21	0,76 ± 0,08	1,68 ± 0,06	1,55 ± 0,25	1,75 ± 0,47
C21	0,33 ± 0,18	0,29 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,33 ± 0,09

Tabla 24. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de *S. capitis*.

	SC32	SC33	SC34	SC35
Σ ISO	35,72 ± 1,63	36,09 ± 1,04	37,03 ± 0,61	36,94 ± 1,52
Σ ANTEISO	48,18 ± 3,47	48,98 ± 2,44	49,03 ± 1,91	47,88 ± 4,72
Σ LINEALES	16,09 ± 2,59	14,93 ± 2,65	13,94 ± 1,31	15,18 ± 3,22
Σ C. LARGA	35,17 ± 8,95	34,35 ± 5,75	35,95 ± 4,63	38,14 ± 8,19

RESULTADOS

3 Influencia de daptomicina en la composición lipídica de *S. capitis*

3.1 ESI-TOF-MS

Al cultivar los aislados SC32 y SC35 en medio líquido, tanto en ausencia como en presencia de daptomicina, se observó que el antibiótico actuaba de manera diferente al estar en ambos.

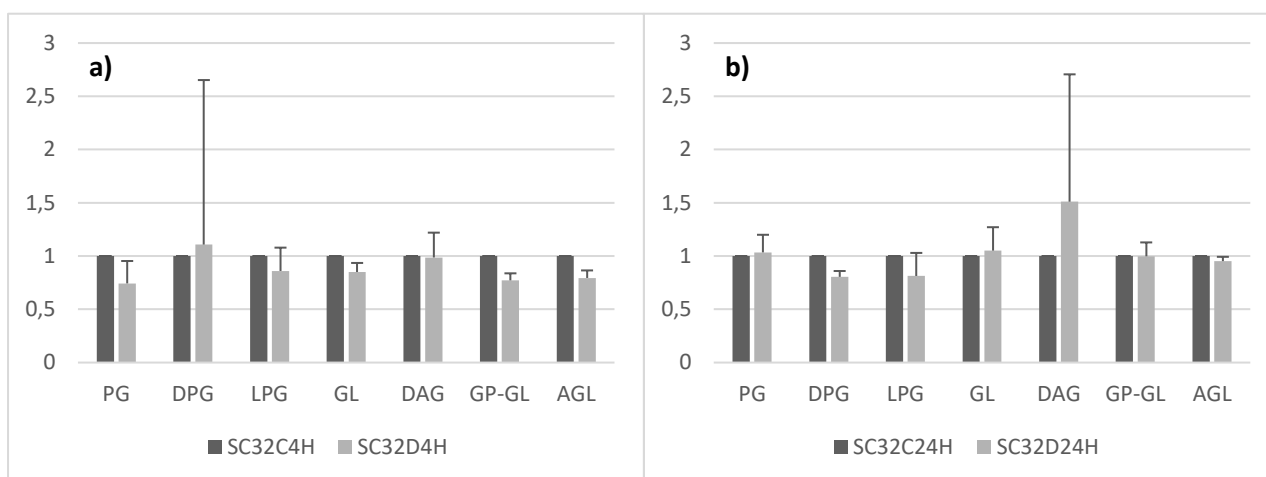


Figura 38. Composición lipídica de la membrana bacteriana de SC32 en medio líquido en ausencia (control) y presencia de daptomicina, a) 4h de cultivo, b) 24h de cultivo. Los resultados se expresan comparando daptomicina *versus* control.

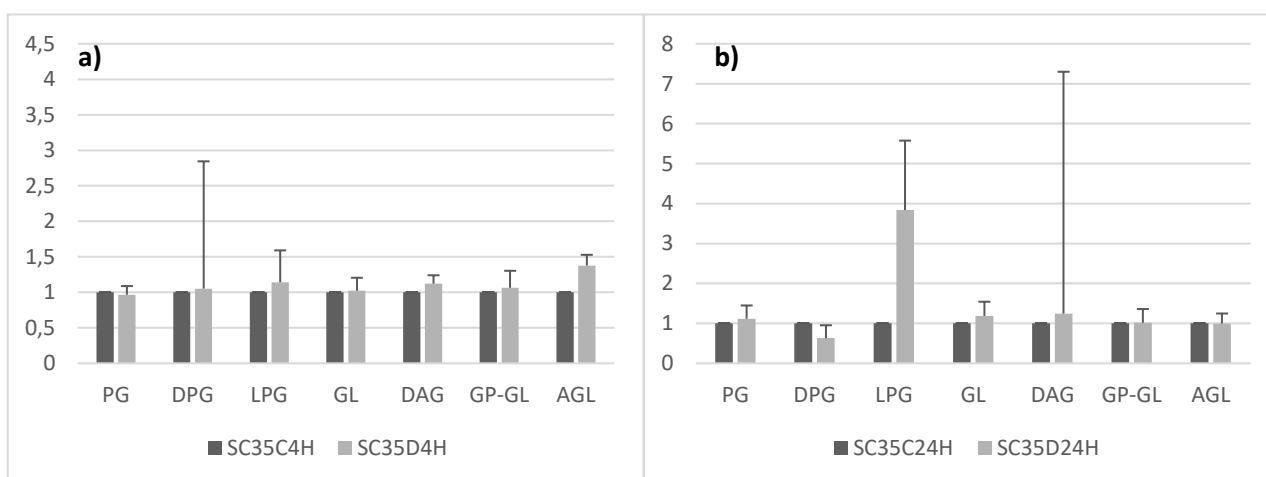


Figura 39. Composición lipídica de SC35 en medio líquido en ausencia (control) y presencia de daptomicina, a) 4h de cultivo, b) 24h de cultivo. Los resultados se expresan comparando daptomicina *versus* control.

En SC35 a las 4h de cultivo en presencia de daptomicina (Fig. 39a) se constató un pequeño aumento en la cantidad de LPG y DAG, y otro más pronunciado de AGL,

RESULTADOS

resultando ser este último estadísticamente significativo ($P = 0,014$). A las 24h de cultivo con el antibiótico (Fig. 39b) se observó una disminución de DPG y un incremento en LPG, GL y DAG, aunque ninguno de los cambios observados fue estadísticamente significativo.

Adicionalmente, los datos revelaron que, al igual que en medio sólido, las composiciones lipídicas globales de ambos aislados son diferentes cuando se comparan a las 4h (Figs. 40a, 40b) y a las 24h (Figs. 41a, 41b), independientemente del antibiótico.

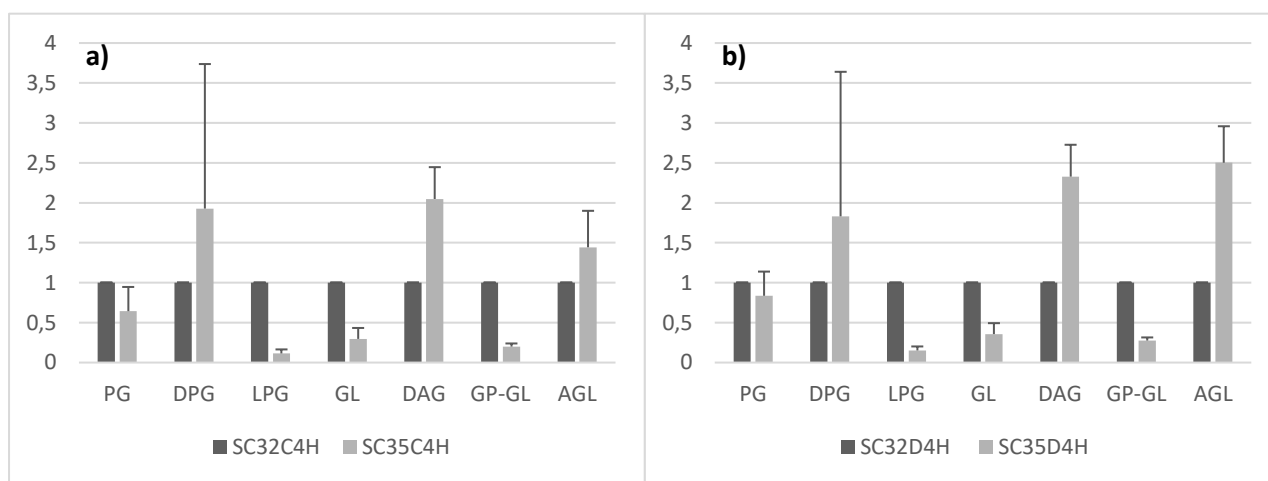


Figura 40. Composición lipídica de SC35 *versus* SC32 en medio Mueller-Hinton caldo a las 4h de cultivo en: a) ausencia de daptomicina, b) presencia de daptomicina.

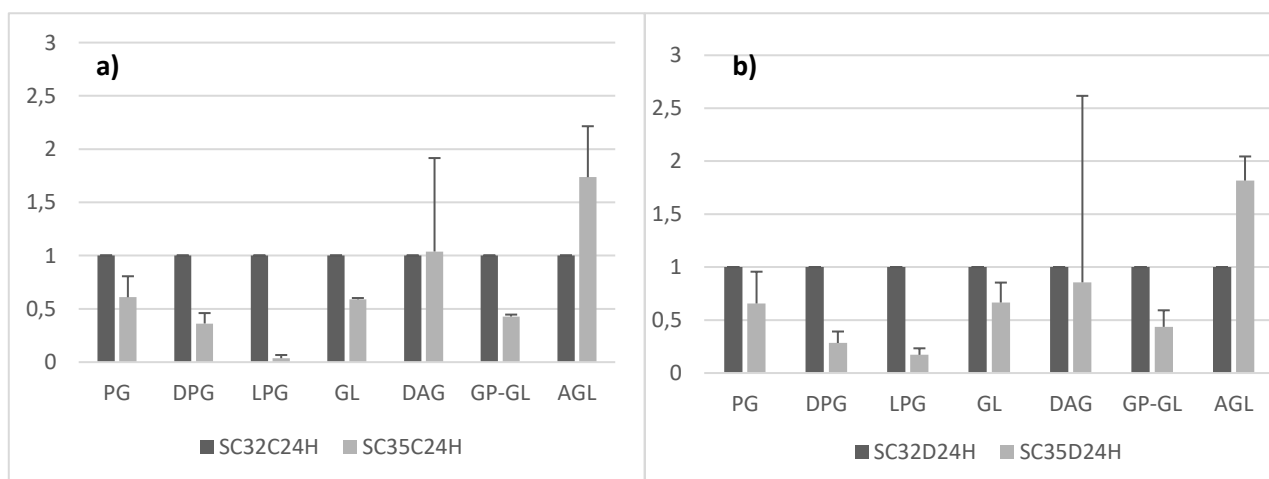


Figura 41. Composición lipídica de SC35 *versus* SC32 en medio Mueller-Hinton caldo a las 24h de cultivo en: a) ausencia de daptomicina, b) presencia de daptomicina.

RESULTADOS

A las 4h de cultivo tanto en presencia como en ausencia de daptomicina, SC35 presentó, en relación con SC32, las mismas diferencias en la composición lipídica, es decir, una mayor cantidad de DPG, DAG y AGL, y un menor contenido de PG, LPG, GL y GP-GL. El análisis estadístico reveló que las diferencias observadas en LPG, GL, DAG y GP-GL fueron significativas. Además, en presencia de daptomicina también resultó ser estadísticamente significativa el aumento de AGL.

A las 24h de cultivo se observó un patrón de lípidos similar al observado con el cultivo a las 4h, tanto en ausencia como en presencia del antibiótico; es decir, menor cantidad de PG, DPG, LPG, GL y GP-GL, y mayor de AGL. En el medio con daptomicina se encontró menor cantidad de DAG en SC35 con respecto al medio control sin daptomicina. En ausencia de daptomicina, las diferencias en PG, DPG, LPG, GL, GP-GL y AGL fueron estadísticamente significativas, al igual que -exceptuando PG- en presencia del antibiótico.

3.2 Distribución de los grupos acilo entre los distintos lípidos de membrana

Al realizar este análisis también se estudió la distribución de los ácidos grasos mayoritarios en los lípidos de SC32 y SC35. En todas las condiciones de cultivo estudiadas, se observó el mismo resultado que en medio sólido.

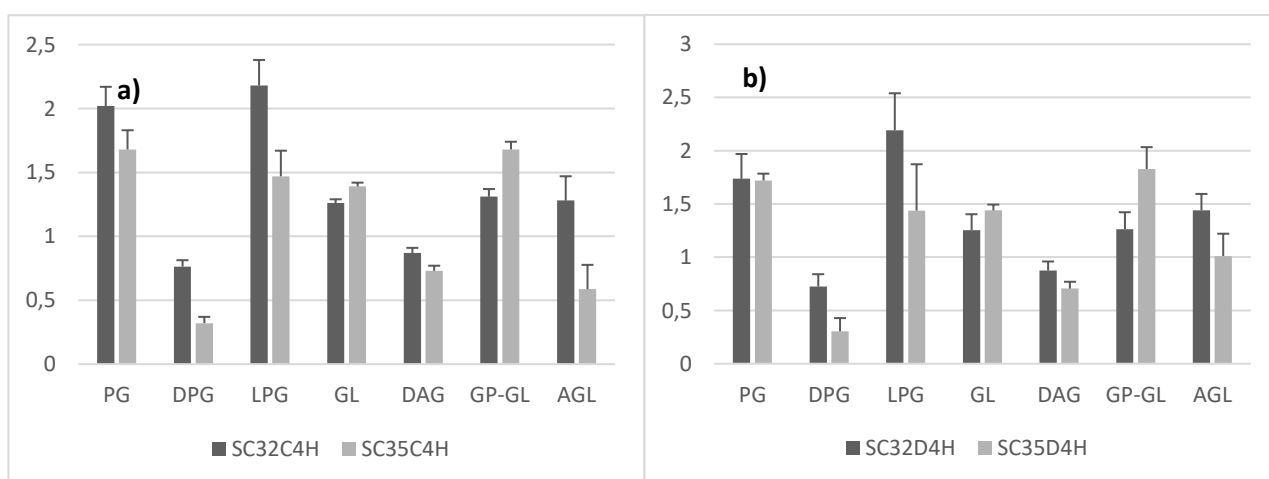


Figura 42. Relación entre las especies moleculares mayoritarias de los lípidos de SC32 y SC35 a 4h de cultivo en: a) ausencia de daptomicina (C), b) presencia de daptomicina (D).

En ausencia de daptomicina (Fig. 42a), y para ambos aislados, se apreció que los grupos acilo más cortos (combinaciones de C15 + C17) se acumulaban en PG, LPG, GL, y

RESULTADOS

GP-GL, y los más largos (combinaciones C15 + C19) en DPG y DAG. Al comparar SC32 y SC35, los resultados fueron estadísticamente significativos para DPG, LPG, DAG y AGL.

A las cuatro horas de cultivo en presencia de daptomicina (Fig. 42b) se observó un patrón similar, aunque con ligeras variaciones para AGL; es decir, SC35 tiende a acumular, por igual los ácidos grasos de cadena larga y de cadena corta, mientras que SC32 tiende a acumular los de cadena corta. Las diferencias entre ambos aislados fueron estadísticamente significativas para DPG, DAG, GP-GL y AGL.

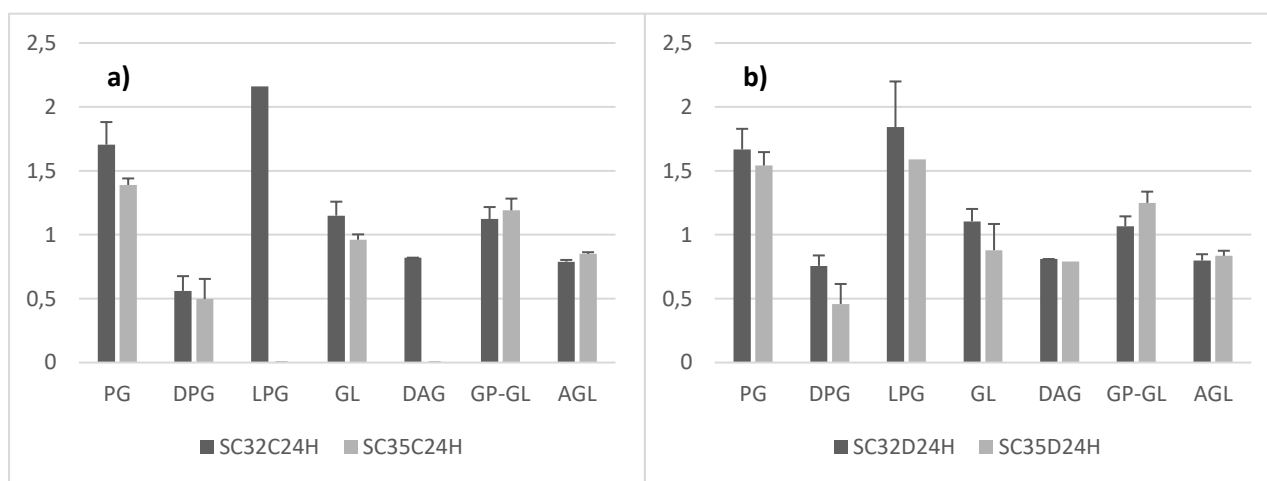


Figura 43. Relación entre las especies moleculares mayoritarias de los lípidos de SC32 y SC35 a 24h de cultivo en: a) ausencia de daptomicina (C), b) en presencia de daptomicina (D).

En ambos aislados, y tras 24h de cultivo, tanto en ausencia (Fig. 43a) como en presencia del antibiótico (Fig. 43b), los grupos acilo más cortos se sitúan con preferencia en PG, mientras que los de cadena larga lo hacían en DPG y AGL. Para LPG y DAG no se pudo medir si había diferencias entre los aislados en el medio control. En este caso, no se dieron diferencias estadísticamente significativas entre SC32 y SC35.

3.3 GC-MS

Al igual que en medio sólido, en ambos aislados se encontraron cadenas de ácidos grasos cuya longitud variaba entre 14 y 21 carbonos.

En SC32, y en contraposición con los datos obtenidos en medio sólido, los ácidos grasos mayoritarios fueron C16 y C18 en cualquiera de las condiciones estudiadas (Tabla 25), no siendo estadísticamente significativas las diferencias encontradas, incluso cuando se consideró la composición entre los distintos tipos estructurales (Tabla 26).

RESULTADOS

Tabla 25. Composición (%) de ácidos grasos de SC32 en ausencia (control) y presencia de daptomicina tras 4h y 24h de cultivo.

Ácido graso	SC32C4H	SC32D4H	SC32C24H	SC32D24H
iso-C14	0,59 ± 0,11	0,39 ± 0,18	0,42 ± 0,10	0,52 ± 0,09
C14	0,44 ± 0,04	0,35 ± 0,08	0,28 ± 0,09	0,36 ± 0,11
iso-C15	3,86 ± 0,49	3,03 ± 0,87	3,96 ± 0,55	4,40 ± 0,74
ai-C15	14,34 ± 0,55	11,97 ± 2,23	14,29 ± 1,45	15,52 ± 1,52
C15	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,03
iso-C16	1,38 ± 0,21	1,23 ± 0,37	1,32 ± 0,28	1,30 ± 0,34
C16	20,95 ± 2,36	22,13 ± 3,48	16,67 ± 2,16	15,93 ± 2,09
iso-C17	6,48 ± 0,82	6,21 ± 1,13	6,97 ± 0,94	6,97 ± 0,93
ai-C17	10,71 ± 0,70	10,48 ± 1,01	11,43 ± 0,73	11,82 ± 0,54
C17	0,43 ± 0,10	0,45 ± 0,14	0,45 ± 0,12	0,41 ± 0,12
iso-C18	2,11 ± 0,21	2,12 ± 0,39	2,51 ± 0,59	2,18 ± 0,47
C18	19,17 ± 2,03	21,47 ± 3,27	16,76 ± 1,46	15,50 ± 1,19
iso-C19	5,77 ± 0,58	5,93 ± 0,84	7,39 ± 0,67	7,41 ± 0,59
ai-C19	7,34 ± 0,18	7,56 ± 0,62	9,18 ± 0,58	9,57 ± 0,70
C19	1,40 ± 0,23	1,49 ± 0,42	1,74 ± 0,44	1,66 ± 0,42
iso-C20	0,44 ± 0,09	0,45 ± 0,12	0,52 ± 0,16	0,56 ± 0,14
C20	3,75 ± 0,29	3,88 ± 0,55	4,84 ± 0,60	4,56 ± 0,69
iso-C21	0,33 ± 0,14	0,31 ± 0,14	0,46 ± 0,19	0,48 ± 0,19
ai-C21	0,32 ± 0,09	0,36 ± 0,11	0,57 ± 0,13	0,62 ± 0,16
C21	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,06	0,16 ± 0,07	0,14 ± 0,07

Tabla 26. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de SC32 en ausencia (C) y en presencia de daptomicina (D) a 4h y 24h de cultivo.

	SC32C4H	SC32D4H	SC32C24H	SC32D24H
Σ ISO	20,96 ± 2,53	19,67 ± 3,36	23,55 ± 2,99	23,82 ± 3,08
Σ ANTEISO	32,71 ± 1,26	30,38 ± 2,47	35,47 ± 0,88	37,53 ± 1,48
Σ LINEALES	46,33 ± 3,73	49,95 ± 5,49	40,98 ± 2,42	38,64 ± 2,03
Σ C. LARGA	40,75 ± 0,54	43,69 ± 2,52	44,13 ± 1,88	42,69 ± 1,89

RESULTADOS

Resultados similares se encontraron para SC35, destacando en este aislado una mayor abundancia, por comparación con SC32, de los ácidos grasos lineales (Tablas 27 y 28).

Tabla 27. Composición (%) de ácidos grasos de SC35 en ausencia (C) y presencia de daptomicina (D) a 4h y 24h de cultivo.

Ácido graso	SC35C4H	SC35D4H	SC35C24H	SC35D24H
iso-C14	0,07 ± 0,008	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,04
C14	0,48 ± 0,42	0,27 ± 0,17	0,30 ± 0,08	0,32 ± 0,09
iso-C15	1,55 ± 1,12	2,19 ± 1,19	3,99 ± 0,48	3,65 ± 0,78
ai-C15	5,33 ± 3,46	9,52 ± 6,21	13,30 ± 2,58	13,47 ± 3,27
C15	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,03
iso-C16	0,17 ± 0,14	0,21 ± 0,09	0,38 ± 0,09	0,33 ± 0,09
C16	30,13 ± 8,53	25,12 ± 6,81	17,47 ± 1,72	18,29 ± 1,43
iso-C17	3,73 ± 1,85	4,75 ± 1,09	6,58 ± 0,37	6,13 ± 0,75
ai-C17	5,63 ± 1,99	8,28 ± 2,89	9,88 ± 0,81	10,36 ± 1,31
C17	0,24 ± 0,08	0,24 ± 0,07	0,27 ± 0,09	0,28 ± 0,09
iso-C18	0,47 ± 0,27	0,56 ± 0,13	0,97 ± 0,19	0,84 ± 0,23
C18	34,85 ± 8,56	27,44 ± 9,87	17,22 ± 1,14	18,03 ± 1,54
iso-C19	5,82 ± 1,97	6,81 ± 1,18	9,68 ± 0,13	8,87 ± 0,68
ai-C19	6,58 ± 2,38	8,67 ± 3,26	10,96 ± 1,27	11,22 ± 1,49
C19	0,65 ± 0,32	0,74 ± 0,15	1,35 ± 0,28	1,19 ± 0,25
iso-C20	0,16 ± 0,09	0,21 ± 0,04	0,34 ± 0,06	0,29 ± 0,08
C20	2,94 ± 1,15	3,44 ± 0,55	4,84 ± 0,33	4,54 ± 0,43
iso-C21	0,51 ± 0,24	0,58 ± 0,13	0,94 ± 0,23	0,79 ± 0,20
ai-C21	0,56 ± 0,24	0,71 ± 0,23	1,09 ± 0,13	1,03 ± 0,12
C21	0,10 ± 0,007	0,10 ± 0,02	0,19 ± 0,08	0,14 ± 0,02

RESULTADOS

Tabla 28. Porcentaje de los distintos tipos estructurales de ácidos grasos de SC32 en ausencia (C) y en presencia de daptomicina (D) a 4h y 24h de cultivo.

	SC35C4H	SC35D4H	SC35C24H	SC35D24H
Σ ISO	12,46 ± 4,77	15,40 ± 3,63	23,02 ± 0,99	21,04 ± 2,58
Σ ANTEISO	18,09 ± 5,47	27,19 ± 12,44	35,23 ± 4,47	36,08 ± 5,80
Σ LINEALES	69,44 ± 10,22	57,41 ± 15,68	41,75 ± 3,52	42,87 ± 3,64
Σ C. LARGA	52,64 ± 11,19	49,27 ± 5,28	47,59 ± 1,26	46,96 ± 2,01

3.4 ESI-TOF-MS/MS

La gran abundancia de ácidos grasos lineales en *S. capitis*, esencialmente C16 y C18, en caldo MH, nos llevó a plantear la hipótesis de que esta bacteria podría cambiar la composición fina de sus grupos acilo en los distintos lípidos, por lo que recurrimos a la técnica ESI-TOF-MS/MS para verificarlo. Como es sabido, PG es el fosfolípido mayoritario de estafilococos, y de él derivan LPG y DPG, y, por extensión, DAG (Kuhn et al., 2015).

Un espectro MS/MS de PG (m/z 721, especie molecular mayoritaria) de SC32 aparece en la Fig. 44. En él pueden observarse fragmentos importantes a m/z 241 y m/z 269, que corresponden, respectivamente, a la liberación de grupos acilo C15 y C17, lo que demuestra que este compuesto no contiene grupos acilo correspondientes a C16 y C18, o los posee en muy baja cantidad, como cabría esperar de la composición general de ácidos grasos mostrada en la Tabla 25.

Por otro lado, la mayor abundancia de los iones m/z 479 y m/z 497 sobre las de m/z 451 y m/z 469, indica que C15 ocupa la posición sn-2, y C17 la posición sn-1 en PG. Los resultados fueron idénticos para LPG y GL (datos no mostrados) -también en el caso de SC35- por lo que se concluyó que esta bacteria mantiene el perfil característico de lípidos de membrana publicado previamente para *Staphylococcus* (Komaratat & Kates, 1975).

RESULTADOS

Hasta ahora, la presencia mayoritaria de ácidos grasos C16 y C18 en *S. capitis* cultivado en caldo MH está por aclarar, pero es probable que abunden en forma de triacilglicerol o ácidos grasos libres.

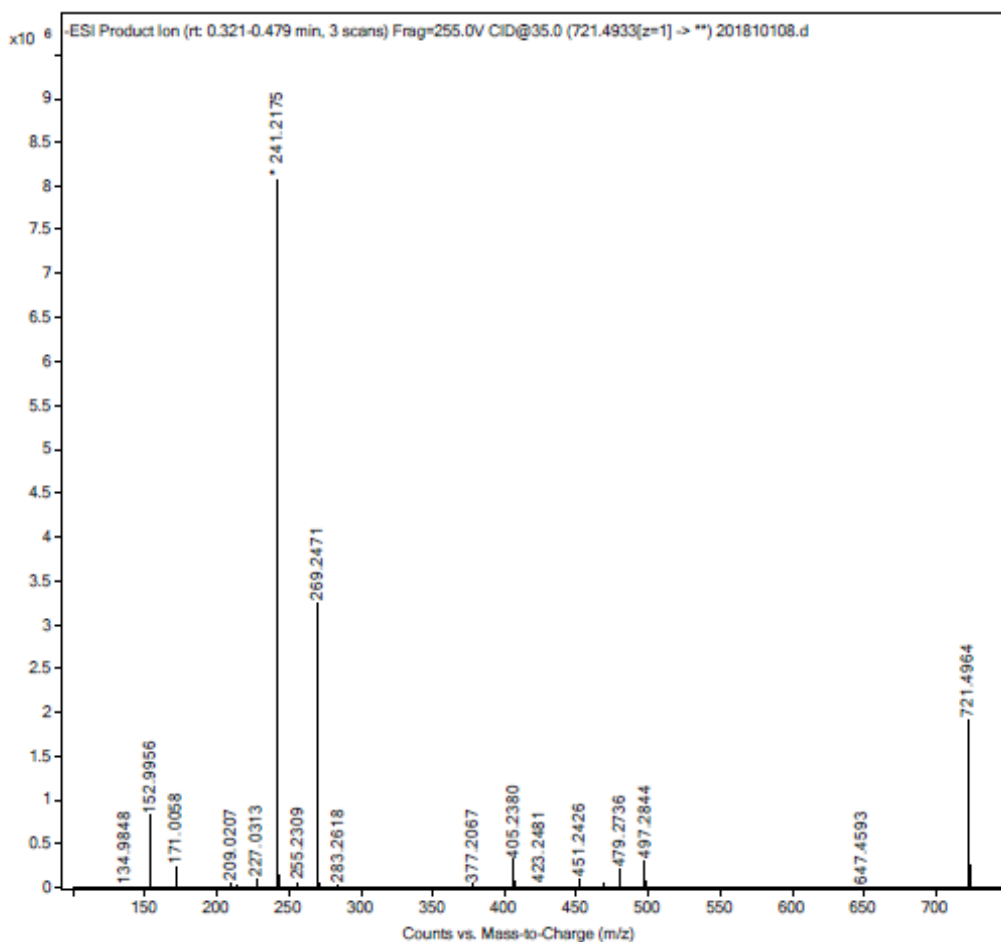


Figura 44. Espectro MS/MS de PG (m/z 721) de SC32, ilustrando el hecho de que los grupos acilo (ácidos grasos) mayoritarios de los lípidos de membrana se corresponden con los ácidos grasos de cadena impar C15 y C17.

4 Estudio del grosor de la envoltura celular de SC32 y SC35

La microscopía electrónica de transmisión reveló un grosor de pared de $45,514 \pm 6,28$ nm en la cepa SC32 (Fig. 45a) y de $71,35 \pm 10,56$ nm en el aislado SC35 (Fig. 45b). La diferencia resultó estadísticamente significativa.

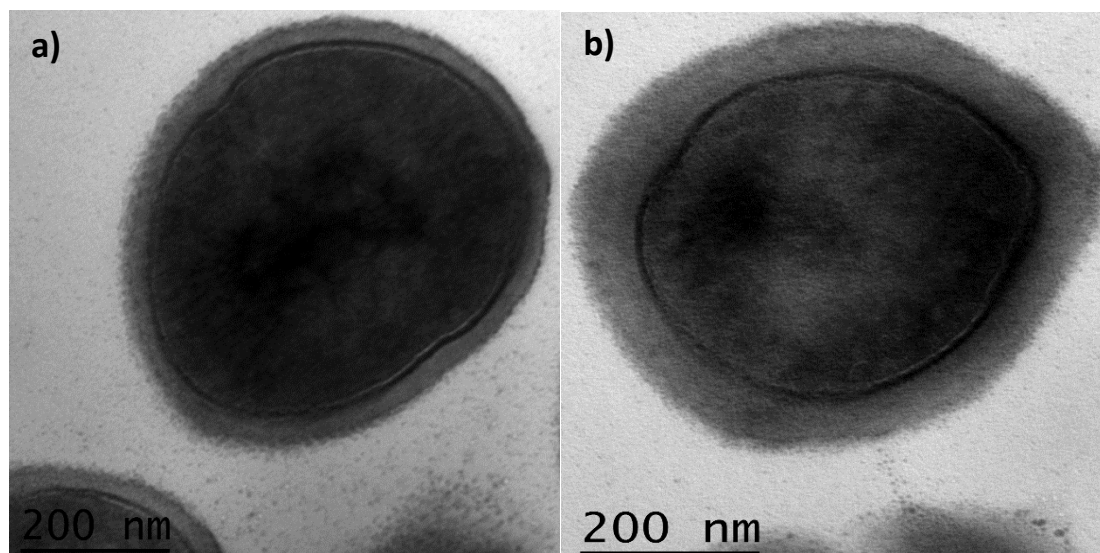


Figura 45. Microscopía electrónica de: a) SC32, b) SC35

5 Secuenciación del cromosoma de *S. capitis* y análisis bioinformático

Los cromosomas de SC32 y SC35 presentaron un total de 2,5 Mpb, equivalentes a 2648 genes que correspondían con 2450 CDS, 62 ARNt, 13 ARNr y 1 ARNtm.

Integrado en el cromosoma de cada aislado se detectó un fragmento de 0,13 Mpb, posiblemente de origen extracromosómico, ya que en él se localizaron secuencias correspondientes a transposasas y genes de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, tales como *blaZ*, *mecA_2* y *mecR1*. También se encontraron en este fragmento los genes *qacA* y *qacB*, codificantes de bombas de extrusión transportadoras de amonio cuaternario, de origen plasmídico (Hong et al., 2019). De manera sorprendente se observó que la posición de estos genes no era la misma en los dos aislados, ya que en SC35 se encontraban invertidos con respecto a la posición de SC32.

Las mutaciones se establecieron como cambios en el genoma el SC35, (resistente a daptomicina), con respecto a SC32 (sensible a daptomicina). Con estos criterios se observaron mutaciones en los genes *tlyC*, *dhbC*, *rnJ2*, *ATP sintasa*, *qacB*, un gen de función desconocida, así como en la región intergénica del gen *FapR* (Tabla 29). Mediante secuenciación de Sanger se pudo confirmar que todas las mutaciones observadas en la secuenciación del cromosoma se encontraban presentes.

RESULTADOS

Tabla 29. Mutaciones detectadas en el cromosoma de SC35.

Gen	Cambio de nucleótidos	Función proteica	Cambio de aminoácidos
<i>tlyC</i>	G709T	Hemolisina C	Asp237Tyr
<i>dhbC</i>	C810A	Isocromato sintasa	Val270Val
<i>rnJ2</i>	A1460G	Ribonucleasa J2	Asp487Gly
<i>ATP sintasa</i>	T7C	Cadena I de ATP sintasa	Cys3Arg
<i>Gen de función desconocida situado entre los genes queH y tetR</i>	G58C	Proteína hipotética	Asp20His
<i>qacB</i>	G317A	Transportador de amonio	Ser106Asn
-	C/T	Región intergénica de <i>fapR</i>	-
-	T/A	Región intergénica de los genes <i>psf1</i> y <i>lipA_3</i>	-

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Desde que se aprobó el uso de daptomicina frente a infecciones producidas por microorganismos Gram-positivos multirresistentes, este antibiótico se ha empleado, conjuntamente con vancomicina y linezolid, como último recurso en el tratamiento de infecciones ocasionadas, principalmente, *S. aureus* resistente a meticilina (Gray & Wenzel, 2020). Su mecanismo de acción es todavía desconocido, aunque en los últimos años han surgido nuevas hipótesis sobre su interacción, bien demostrada, con la membrana plasmática bacteriana (Grein et al., 2020; Müller et al., 2016). La aparición de resistencia (Gómez Casanova et al., 2017; Hagiya et al., 2018) es un hecho infrecuente en la actualidad, pero supone un fracaso del tratamiento, que puede complicar el pronóstico de determinados pacientes (Grein et al., 2020; Müller et al., 2016).

Las bases moleculares de la resistencia a daptomicina se han estudiado en los patógenos clínicos más relevantes, como *S. aureus* y *E. faecium*, (Baltz, 2009; Bayer, Schneider, & Sahl, 2013; Heidary et al., 2017; Miller et al., 2016), sin embargo, faltan datos para otros microorganismos oportunistas, tales como *S. capitis* (Rincon et al., 2014) considerado en la actualidad un patógeno emergente. A día de hoy, esas bases se relacionan, en general con varios genes reguladores de la homeostasis de la envoltura celular (Baltz, 2009; Cameron et al., 2015b; Gómez Casanova et al., 2017; Müller et al., 2018), y notablemente, con genes implicados en las modificaciones de fosfatidilglicerol, diana del antibiótico, destacando *mprF* (Khatib et al., 2016) y *cls2* (Davlieva, Zhang, Arias, & Shamoo, 2013), aunque se han propuesto mecanismos de resistencia alternativos (Pader et al., 2016; Song et al., 2013).

Los estudios señalan que cada microorganismo estudiado lleva una huella genética y fenotípica específica, de forma que es fácil admitir la idea expresada por varios autores de que la resistencia a daptomicina en bacterias Gram-positivas es, en esencia, dependiente de cada cepa, aun más cuando las posibles mutaciones implicadas no son únicas ni en un solo gen (Baltz, 2009; Bayer et al., 2015; Ernst & Peschel, 2019; Heidary et al., 2017; Jiang et al., 2019a), de ahí la doble aproximación que se ha realizado en este estudio, cuya discusión separamos a continuación para cada especie estudiada.

Staphylococcus aureus

S. aureus es un microorganismo comensal que se encuentra de manera natural colonizando piel y mucosas, capaz de actuar como patógeno oportunista causando infecciones graves en estos tejidos (Mehraj et al., 2016; Mohammed et al., 2018), debido a su capacidad de formar biopelículas, estructura que le permite crecer sobre superficies formando una matriz protectora, y que ha sido ampliamente relacionada con la adquisición de resistencia a distintos antibióticos (Lister & Horswill, 2014; Mohammed et al., 2018), ya que proporciona un ambiente que favorece la transferencia horizontal de genes (Bowler, 2018). Por otra parte, la baja concentración de antibiótico que penetra dentro de un biofilm también juega un papel importante en la aparición de resistencia, ya que la exposición a concentraciones subinhibitorias actúa como señal de estrés bacteriano capaz de activar diversas rutas metabólicas que alteran la expresión de algunos genes (Venkatesan, Perumal, & Doble, 2015).

La resistencia a daptomicina ha sido ampliamente estudiada en aislados de *S. aureus*, debido a su gran relevancia clínica, ya que se considera uno de los principales microorganismos causantes de infecciones tanto nosocomiales como comunitarias (Lee et al., 2017). Los estos estudios con varios aislados secuenciales de un mismo paciente son escasos en la bibliografía, por esta razón la investigación realizada en nuestro laboratorio puede aportar importantes hallazgos sobre la adquisición *in vivo* de la resistencia a antibióticos en *S. aureus*.

Población heterogénea en *S. aureus*

Las diferencias en la composición de lípidos y en el antibiograma, observadas entre los cinco aislados de *S. aureus*, indicaría que la causa de la endocarditis en este paciente se debe a la formación de un biofilm por este microorganismo (Hall & Mah, 2017), donde es común encontrar subpoblaciones que presentan distintos perfiles transcriptómicos y proteómicos, lo que en ocasiones lleva a fenotipos diferentes, pudiéndose distinguir una población heterogénea del mismo microorganismo (Hall & Mah, 2017; Yan & Bassler, 2019), lo que justificaría el aislamiento en un mismo día de los aislados SA3 y SA4 con variaciones en el perfil de resistencia a antibióticos y en el lipídico.

Composición lipídica y resistencia a daptomicina

Los datos globales de la composición lipídica obtenidos coinciden con los existentes en la bibliografía, tanto para ácidos totales (O'Donnell, Nahaie, Goodfellow, Minnikin, & Hájek, 1985) como para fosfolípidos y glicolípidos (Kuhn et al., 2015). Los patrones específicos de las distintas cepas resultaron ser diferentes, y, muy notablemente, destaca el de SA2, la única resistente a daptomicina, por su alto contenido en LPG, característica que parece innata, dado que se expresa en todas las condiciones de cultivo estudiadas (Figs. 26, 30 y 31).

Los altos niveles de LPG en la membrana plasmática han sido ampliamente relacionados con la resistencia a daptomicina, facilitando el fenómeno de repulsión del antibiótico (Ernst & Peschel, 2019; Khatib et al., 2016), por lo que este hallazgo podría justificar el fenotipo de resistencia a daptomicina que observamos en SA2.

Se puede descartar otro factor también relevante como es la composición en ácidos grasos (Boudjemaa et al., 2018), puesto que no se dan variaciones significativas entre los distintos aislados estudiados. Por otro lado, algunos estudios han mostrado la influencia de DPG sobre la actividad de daptomicina; donde se relaciona un incremento del fosfolípido con la resistencia al antibiótico, al provocar un engrosamiento de la membrana celular y dificultar la interacción de la membrana bacteriana con el complejo Ca^{2+} -DAP (Davlieva et al., 2013; Gómez Casanova et al., 2017; Tran et al., 2015). Sin embargo, la disminución generalizada con respecto a la cepa control, SA1, que muestran, tanto SA2 como el resto de las cepas, descartan la contribución de DPG en la resistencia al antibiótico.

También se observaron variaciones significativas en el contenido de GL entre SA1 y SA2 (Figs. 30 y 31). Un incremento de este lípido podría asociarse, a una menor carga neta negativa en la membrana (Cafiso et al., 2014), lo que no concuerda con el hecho de que los niveles de GL sean menores en SA2 mientras se mantienen los de PG, por lo que es probable que no sea la causa de la resistencia al antibiótico.

Las cepas mencionadas presentan también diferencias estadísticamente significativas en los niveles de AGL a las 4h de cultivo (Fig. 30). Sin embargo, la posible influencia de estos lípidos sobre la actividad de daptomicina es, hasta ahora, una

DISCUSIÓN

incógnita. Es probable que parte de estos AGL se localicen en la membrana, donde se ha comprobado que controlan, indirectamente, la expresión de algunos factores de virulencia de *S. aureus*, como la producción de hemolisina (Ericson, Subramanian, Frank, & Rock, 2017).

Desde un punto de vista lipídico, las membranas de SA1 y SA2 presentan diferencias sutiles que pueden influir en la interacción con la daptomicina, destacando la mayor cantidad de LPG en SA2, fosfolípido catiónico que ha sido ampliamente relacionado con la resistencia a daptomicina (Bayer et al., 2015; Ernst & Peschel, 2019; Ernst et al., 2018; Soo-Jin et al., 2018). Este aumento parece estar relacionado con la mutación observada en MprF (comentado más adelante). Sin embargo, los cambios en otros lípidos no están asociados a mutaciones en las distintas proteínas implicadas en su síntesis o en distintos sistemas reguladores de la envoltura celular, tal y como indica el análisis genómico efectuado. Debido a estos resultados, las diferencias lipídicas podrían situarse a otros niveles metabólicos más complejos que no se revelan en la comparación de los genomas de ambas cepas.

La ausencia de mutaciones en los genes que influyen en el grosor de la pared, como *rpoB*, *rpoC* e *ycyF* (Tabla 2), justifica el hecho de que las envolturas celulares de SA1 y SA2 sean similares, como lo demuestra la microscopía electrónica de transmisión (Fig. 32). Este hallazgo, unido a la ausencia de mutaciones en *dltABCD* y *graSR* (Tabla 2), que controlan la carga neta de la envoltura celular, y excluyendo la desregulación de su expresión (Bayer et al., 2016), favorecen la idea de que el incremento de LPG pueda considerarse como la causa principal de la resistencia a daptomicina en SA2.

Influencia de daptomicina en la composición lipídica

El estudio de la composición de fosfolípidos y glicolípidos (Figs. 28 y 29) de los aislados SA1 y SA2 en fase exponencial de crecimiento, 4h, y en fase logarítmica, 24h, en medio líquido y presencia de daptomicina, revelaron que su composición se mantenía constante para todas las condiciones de cultivo mencionadas, por lo que la presencia de daptomicina no parece modificar la composición de la membrana bacteriana, al menos en las condiciones experimentales estudiadas.

DISCUSIÓN

El perfil de ácidos grasos presente en los aislados en medio líquido en las distintas condiciones de cultivo estudiadas fue similar para las dos cepas, con el predominio de los ácidos grasos ai-C15 y ai-C17, por lo que la presencia de daptomicina tampoco parece alterar la composición de ácidos grasos de los aislados. Sin embargo, en todos los cultivos en medio líquido se apreció un aumento de los ácidos grasos lineales en torno al 10% con respecto de los resultados observados en medio sólido, por lo que el medio de cultivo podría influenciar la composición de ácidos grasos, aunque no se han encontrado datos en la bibliografía que corroboren esta hipótesis.

El análisis de la posible influencia de daptomicina en la composición lipídica puede considerarse original, ya que no se han encontrado datos similares en la bibliografía, con la excepción de un estudio sobre *Dermabacter hominis* (Valero-Guillén, Fernández-Natal, Marrodán-Ciordia, Tauch, & Soriano, 2016).

Variaciones genéticas

La secuenciación del genoma de los dos aislados reveló que SA2 presenta mutaciones en varios genes con respecto a la cepa sensible, SA1: *purR*, *ebhb_1*, una delección de varios nucleótidos en la región *sar* y *mprF* (Tabla 20).

El gen *purR* pertenece a la familia de reguladores metabólicos *Lacl*, y, en concreto, controla el metabolismo de purinas y actúa como un factor transcripcional que coordina la expresión de genes implicados en el metabolismo y la virulencia de la bacteria (Sause et al., 2019). En algunos estudios se han encontrado cepas de *S. aureus* resistentes a daptomicina que presentaban mutaciones en este gen, pero no se ha podido establecer una relación clara con la resistencia al antibiótico (Berti et al., 2018; Renzoni et al., 2017b); sí se ha establecido que las mutaciones que inactivan la proteína aumentan la virulencia en *S. aureus*, favoreciendo la persistencia de la infección (Miller et al., 2020).

La adhesina Emb fue descubierta en el género *Streptococcus* y se relacionó con la adherencia a otras células, actuando como factor de virulencia, por lo que se cree que en *Staphylococcus* tiene el mismo rol (Wu & De Lencastre, 1999). Las mutaciones en esta proteína nunca han sido relacionadas con la aparición de la resistencia a daptomicina en

DISCUSIÓN

otros estudios. Además, debido a que la mutación no produce ningún cambio a nivel proteico, no parece tener repercusión con el fenotipo de resistencia observado.

También se ha observado una delección de 69 nucleótidos en la parte inicial de la secuencia de un gen de función desconocida, situado en la región *sar* del genoma de *S. aureus*, donde se encuentran los genes *sarA*, *sarB* y *sarC*, relacionados con la producción de hemolisina, además de ejercer como regulador de *agr* (Bayer, Heinrichs, & Cheung, 1996; Cheung, Bayer, & Heinrichs, 1997). Hasta ahora, las mutaciones en este gen no han sido relacionadas con la aparición de resistencia a daptomicina.

El gen *mprF* codifica la enzima del mismo nombre, implicada en la síntesis del fosfolípido LPG y su posterior translocación a la cara externa de la membrana de la bacteria (Davlieva et al., 2013; Ernst & Peschel, 2019; Gómez Casanova et al., 2017; Tran et al., 2015). Las mutaciones en este gen se han relacionado en numerosas ocasiones con la aparición de resistencia a daptomicina, sobre todo las que aparecen en el dominio bifuncional, sintasa y translocasa (Ernst & Peschel, 2011, 2019; Ernst et al., 2018; Soo-Jin et al., 2018).

La mutación encontrada en SA2 se debe a un cambio de timina por citosina en la posición 941 del gen, que provoca la sustitución P314L en la proteína. Esta mutación se encuentra en el dominio bifuncional de MprF y ha sido descrita en otros estudios (Bayer et al., 2015; Ernst & Peschel, 2019; Kang et al., 2017), aunque en algunos de ellos se ha señalado que no es suficiente para provocar la resistencia a daptomicina (Ernst & Peschel, 2019; Ernst et al., 2018). Sin embargo, para SA2, esta mutación puede considerarse la causa de la resistencia al antibiótico, al relacionarse con un mayor contenido en LPG en la membrana de la bacteria, como se describe en la bibliografía, tanto para cepas sensibles como resistentes a meticilina de *S. aureus* (Bayer et al., 2015; Kang et al., 2017).

Recientemente, varios estudios han propuesto que cuando se producen SNPs en *mprF* suficientes para desarrollar la resistencia a daptomicina, no se produce un incremento real en la expresión del gen ni en la cantidad de LPG de la membrana, sino que estas mutaciones provocarían un cambio conformacional en MprF que afectaría a su interacción con daptomicina, aunque está por determinar cuál sería esa interacción y

DISCUSIÓN

si es directa o indirecta (Ernst & Peschel, 2019; Ernst et al., 2018). A raíz de estos hallazgos, es necesario preguntarnos cual es realmente la función de la mutación detectada en SA2, y si el incremento de LPG observado está relacionado con ella o con cambios metabólicos globales que no pueden detectarse solo por el estudio de los cambios genéticos, tal y como describía la teoría de la repulsión (Fig. 46) (Peleg et al., 2012) aunque con respecto a nuestros aislados sea la hipótesis más plausible para explicar la resistencia a daptomicina.

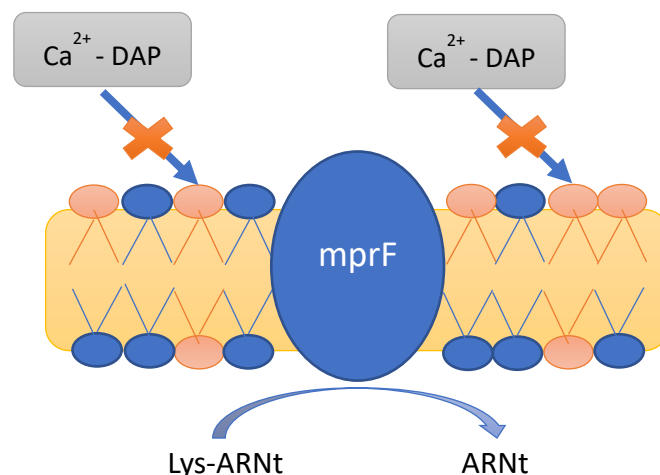


Figura 46. Esquema de la teoría de repulsión. En rojo se muestran las moléculas de LPG y en azul las de PG. Imagen de elaboración propia basada en (Peleg et al., 2012)

Efecto “seesaw” y mutación en *mprF*

Aunque no se encuentra entre los objetivos de esta tesis, se ha creído conveniente discutir el hecho de que la cepa SA2 presente el efecto “seesaw”. Este fenómeno se produce cuando se da una disminución de la CMI a antibióticos β -lactámicos a la vez que se incrementa la de antibióticos como daptomicina o vancomicina (Barber, Ireland, Bukavyn, & Rybak, 2014; Hines et al., 2020). De acuerdo con la Tabla 12, SA2 aparece como sensible a oxacilina y resistente a daptomicina, fenotipo contrario al primer aislado SA1, por lo que interpretamos que se ha producido el efecto citado. Destaca el hecho de que en SA2 no existen alteraciones en los genes relacionados con la resistencia a penicilinas ni a otros β -lactámicos, y que PBP2a se pudo detectar con el test de inmunocromatografía en todos los aislados estudiados.

DISCUSIÓN

Se ha sugerido que el efecto “seesaw” puede estar relacionado con cambios en la proteína PrsA, implicada en el plegamiento post-translocacional de diversas proteínas situadas en la superficie de la envoltura celular, tales como las PBP2s (Jousselin et al., 2016; Renzoni et al., 2017a). PrsA es modificada a una acil-proteína por Lgt, lipoproteína implicada en la modificación de otras proteínas por transferencia de una molécula de diacilglicerol y requiere PG para ejercer su función (Mohammad et al., 2019). Un exceso de LPG, relacionado con mutaciones en MprF, inhibe la acción de Lgt, y la inserción de PrsA en la membrana (Fig. 47), sin la cual es incapaz de activar PBP2a, necesaria para la síntesis de peptidoglicano (Zhan & Zhu, 2018).

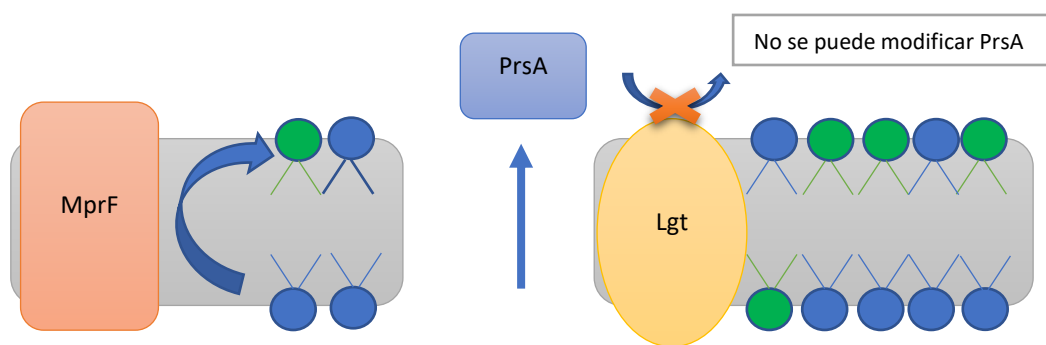


Figura 47. Modelo propuesto de la implicación de mprF en el efecto “seesaw”. En verde se representa el LPG y en azul PG. Imagen de elaboración propia basada en (Renzoni et al., 2017a).

En un estudio previo (Renzoni et al., 2017a) se había descartado la influencia de la mutación P314L, presente en SA2, en el efecto “seesaw”, aunque la combinación de daptomicina y oxacilina producía la inhibición del crecimiento de la cepa resistente a ambos antibióticos estudiada por estos autores y denominada CB5036. Este trabajo no incluye datos adicionales de lípidos que permitan hacer una comparación más exhaustiva entre SA2 y CB5036, pero a partir de nuestros resultados podemos afirmar que el cambio P314L puede situarse en el contexto del modelo representado en la Fig. 46 y, considerarla como la causante del efecto “seesaw”.

Staphylococcus capitis

Staphylococcus capitis es un estafilococo coagulasa negativo que se encuentra de manera natural en la piel (Natsis & Cohen, 2018) que durante mucho tiempo se consideró como un microorganismo comensal no patógeno (Kloos, 1980). Sin embargo, desde hace años, se ha convertido en uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales, especialmente en neonatos, debido a su capacidad para formar biofilms (Laurent & Butin, 2019; Tevell et al., 2017).

La resistencia a daptomicina en *S. capitis* no es tan frecuente como en otros SCN, por lo que no ha sido tan estudiada como en otros microorganismos (Lourtet-Hascoët et al., 2018), aunque en los últimos años se ha observado un significativo aumento de la aparición de resistencia a daptomicina en este microorganismo (Jiang et al., 2019a), además no se han realizado estudios in vivo de la aparición de la resistencia a este antibiótico

Relación entre el tratamiento con vancomicina y la aparición de resistencia a daptomicina

Los cuatro aislados de *S. capitis* presentaron un perfil de sensibilidad diferente para la daptomicina. La primera cepa aislada, SC32, resultó ser sensible, y tras el tratamiento del paciente con vancomicina, linezolid y piperaciclina-tazobactan, los aislados posteriores, SC33, SC34 y SC35, mostraron un fenotipo de resistencia a daptomicina. Se ha descrito que la exposición a vancomicina en *S. aureus* puede provocar la aparición de resistencia a daptomicina cuando surgen mutaciones que provocan el engrosamiento de la envoltura bacteriana (Bayer et al., 2013; Moise, North, Steenbergen, & Sakoulas, 2009). Las mutaciones más habituales asociadas a este fenómeno se producen en el operón *agr*, encargado de regular diferentes rutas metabólicas relacionadas con la virulencia de la bacteria (Sakoulas, Moellering, & Eliopoulos, 2006), y en *rpoB*, gen codificante de la subunidad β de la ARN polimerasa (Cui et al., 2010). Sin embargo, y tal y como se deriva de la secuenciación de los genomas, no se dan tales mutaciones en SC35, aun cuando posee una envoltura celular mucho

DISCUSIÓN

más gruesa que SC32 (Fig. 45), por lo que el engrosamiento de la envoltura celular debe tener otras bases moleculares y/o metabólicas.

Composición lipídica y resistencia a daptomicina

El estudio de la composición lipídica en medio sólido Mueller-Hinton de los cuatro aislados (Fig. 35) indica que la membrana de la cepa sensible a daptomicina, SC32, es esencialmente distinta a la de las cepas resistentes al antibiótico, SC33, SC34 y SC35, al presentar estas últimas un descenso generalizado en el contenido de DPG, LPG, GL y GP-GL, junto a un aumento de DAG y AGL. Estas diferencias se reflejan también en el perfil de ácidos grasos, destacando el hecho de que las cepas resistentes tienen una mayor abundancia de iC19 (Tabla 23). Los datos de fosfolípidos y glicolípidos están influenciados por el tiempo en cultivo y el medio, como demuestran los resultados a las 4h y 24, tanto en presencia como en ausencia de daptomicina, en caldo Mueller-Hinton (Figs. 40, 41). Sin embargo, las diferencias en DAG y AGL son consistentes en cualquiera de las condiciones experimentales seguidas. En medio líquido vuelven a producirse diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos, destacando los altos niveles de C16 y C18 en SC35.

Contrariamente a lo observado en *S. aureus*, los aislados resistentes de *S. capitis* muestran muy bajos niveles de LPG, por lo que es descartable la influencia de este lípido en el fenotipo de resistencia, de forma similar a como se ha descrito en *E. faecium* (Rashid et al., 2017).

Tanto a las 4h como a las 24h de cultivo en medio líquido, SC35 muestra niveles medios de DPG superiores a SC32. La alta concentración de este fosfolípido se ha relacionado con la resistencia a daptomicina, esencialmente por su contribución al engrosamiento de la membrana plasmática (Davlieva et al., 2013; Zhang et al., 2014), aunque también por su distribución homogénea en la misma (Tran et al., 2015). Así, podría afirmarse que DPG contribuye en cierta medida a la resistencia a daptomicina en SC35, sobre todo cuando los lípidos como GL parecen ir en dirección contraria al fenotipo de resistencia, tal y como también se encontró en *S. aureus*; no obstante, las bajas cantidades de GP-GL contribuirían a reducir la carga negativa neta de la membrana y favorecería la resistencia a daptomicina en la cepa indicada.

DISCUSIÓN

Los altos niveles de DAG en SC35 contribuirían, por su neutralidad, al fenotipo de resistencia, si bien el significado de estos lípidos nunca se ha estudiado en el contexto de la resistencia a daptomicina. DAG es común en el lipidoma de estafilococos y su origen se halla, en gran medida, en la síntesis de LTA (Kuhn et al., 2015). Es necesario preguntarse si la cantidad de DAG en SC35 se relaciona con una mayor síntesis de LTA en esta cepa y, por tanto, un mayor grosor de la pared celular, como muestra la microscopía electrónica (Fig. 45)

Por otra parte, no está claro el papel que puede jugar el aumento de los ácidos grasos libres presentes en la membrana en las cepas resistentes a daptomicina. El “pool” de AGL aporta carga negativa y regula la elasticidad y otras propiedades físicas de la membrana (Ericson et al., 2017), pero no se ha relacionado anteriormente con la aparición de resistencia a daptomicina.

Podría suponerse que la resistencia a la daptomicina en SC35 está relacionada con la composición lipídica de su membrana, donde abundan DPG, DAG y AGL, sin embargo, hay otro dato adicional que surge de la distribución concreta de los grupos acilo en los distintos lípidos de membrana y que diferencia a SC32 de SC35. Esa distribución es desigual y sigue el modelo descrito en estafilococos (Parsons et al., 2014; Parsons, Frank, Subramanian, Saenkham, & Rock, 2011), pero indica que SC35 tiende a tener una longitud de cadena dos carbonos superior a SC32, lo que contribuiría a incrementar la anchura de la membrana y a hacerla más impermeable a la daptomicina, sobre todo porque los grupos acilo de mayor longitud se acumulan en los lípidos más abundantes en SC35, DPG, DAG y AGL (Fig. 42). Este es un dato inédito en la bibliografía, pero que concuerda con lo observado en experimentos con liposomas, donde se demuestra que a mayor longitud de cadena en los grupos acilo de los lípidos, se produce una menor interacción con daptomicina (Berishvili et al., 2018).

Un resultado no esperado, tanto en *S. capitis* como en *S. aureus*, fue la alta proporción de ácidos grasos C16 y C18 que presentaban ambos microorganismos en medio líquido (Tablas 25 y 27) y cuyo origen es hasta ahora desconocido. Podrían ser producto de una incorporación de los existentes en el cultivo y su acumulación posterior como triacilglicéridos, algo que queda sin corroborar. Sí se pudo establecer al estudiar a

DISCUSIÓN

S. capitis, que ese exceso de C16 y C18 no se incorpora ni a fosfolípidos ni a glicolípidos, como tampoco a DAG, aunque sí, en parte, a los AGL -datos no expresados en resultados-. Al analizar mediante MS/MS ESI-TOF el tipo y disposición de grupos acilo en los lípidos característicos de membrana se encontró que seguían la composición y distribución típica de los estafilococos (Parsons et al., 2014; Parsons et al., 2011) donde aiC15 se encontraba predominantemente en posición *sn-2* del glicerol y el resto en la posición *sn-1*, sin una contribución significativa de C16 o C18 en ningún caso.

Notablemente, todos los cambios descritos en los lípidos de las distintas cepas de *S. capitis* se producen sin mutaciones en los genes implicados directamente en su síntesis o regulación. En definitiva, los cambios lipídicos observados entre los diferentes aislados de *S. capitis* indican diferencias significativas en sus membranas, lo que podría afectar a la funcionalidad de enzimas como MprF o Cls2, ya que muchas enzimas de membrana necesitan de un entorno lipídico idóneo para su actividad (Saita, Albanesi, & de Mendoza, 2016).

Influencia de daptomicina en la composición lipídica

Al igual que para *S. aureus*, daptomicina no mostró influencia general sobre la composición lipídica de *S. capitis* en las condiciones experimentales seguidas, lo que implica que *S. capitis* no adapta sus lípidos de manera rápida a la presencia del antibiótico, por lo que la resistencia puede considerarse como un fenómeno innato de SC35.

Variaciones genéticas

Los cambios genéticos encontrados al comparar los genomas de SC32 y SC35 afectaron a *tlyC*, *dhbC*, *rnJ2*, el gen de la cadena I de la ATP sintasa, *quacB*, una proteína hipotética, a la región intergénica de *FapR* y a la zona intergénica de *psf1* y *lipA_3* (Tabla 29). Estas variantes nunca han sido relacionadas con la aparición de la resistencia a daptomicina y ninguno de ellos está implicado, de manera directa, con la síntesis y regulación de la envoltura celular de la bacteria.

El gen *tlyC* codifica la hemolisina C, importante factor de virulencia que facilita la evasión del sistema inmune del hospedador para la infección y proliferación de la

DISCUSIÓN

bacteria, actuando sobre los eritrocitos del hospedador (Cameron et al., 2015a; Mak, Maszewska, & Rozalska, 2008). A bajas concentraciones es capaz de formar poros en su bicapa lipídica, sin embargo, a altas concentraciones actúa como un agente surfactante, provocando la solubilización de la membrana de los eritrocitos (Różalska, Derczyńska, & Maszewska, 2015). La mutación encontrada no afecta al dominio funcional de la proteína y se encuentra en la parte C-terminal, por lo que no se puede determinar cómo afecta esta mutación a la funcionalidad de la proteína.

dhbC codifica la enzima isocromato sintasa, encargada de transformar el corismato en isocorismato, importante precursor para la producción de quinonas y sideróforos (Dosselaere & Vanderleyden, 2001). La mutación genética observada no provoca ningún cambio de aminoácido en la proteína.

El gen *rnJ2* codifica una ribonucleasa relacionada con el metabolismo y la regulación del ARN de la bacteria al formar parte del complejo degradosoma (Fig. 49). El papel que puede jugar en *S. capitis* no ha sido descrito, pero en *S. aureus* algunas mutaciones en el centro activo de la proteína causan grandes defectos en la viabilidad y el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, otras mutaciones parecen no afectar a su función, por lo que se cree que esta proteína no posee función catalítica (Redder, 2018). La mutación observada en SC35 es particular de esta cepa, como demostró un análisis BLAST, pero se encuentra en el extremo C terminal de la enzima y no afecta al centro activo de la proteína, por lo que no está claro que papel puede jugar en la resistencia a daptomicina.

De forma especulativa podría decirse que la mutación Asp487Gly en RnJ2 provocaría cierta desregulación en el complejo degradosoma, lo que permitiría que algunos ARNm tuvieran una vida media “atípica” (Redder, 2018), acabando por influir, por ejemplo, en el grosor de la envoltura celular o en la regulación de la síntesis de lípidos, algo que obliga a volver la mirada a la composición lipídica general de las cepas de *S. capitis* resistentes a daptomicina y a su perfil de ácidos grasos, así como al hecho de que, en general, los grupos acilo de lípidos como DPG o DAG de SC35 tiendan a ser más largos que los de SC32, y quizás aún más allá, a la diferencias globales.

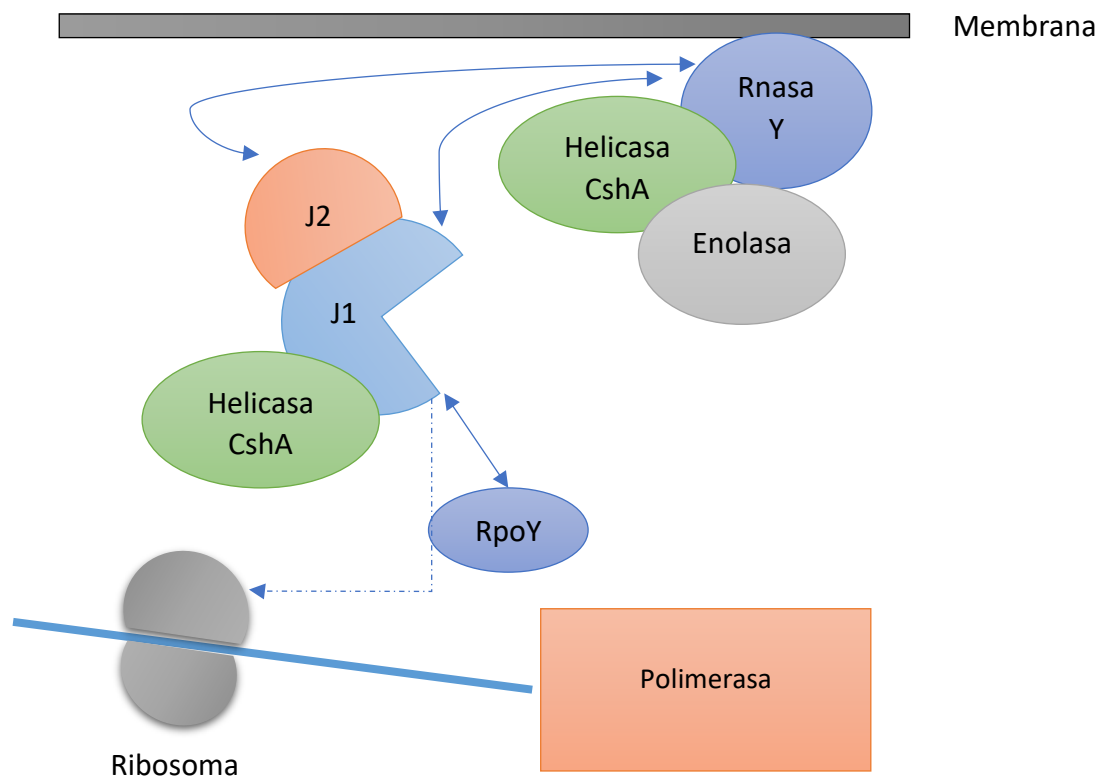


Figura 48. Esquema del funcionamiento del complejo degradosoma en *S. aureus*. Imagen de elaboración propia basado en (Redder, 2018).

El gen de la cadena I de la ATP sintasa se encuentra en el operón que contiene todos los genes relacionados con la proteína ATP sintasa. En concreto, este gen codifica una proteína de membrana con función chaperona necesaria para el ensamblaje del complejo ATP sintasa (Liu, Hicks, & Krulwich, 2013). No se sabe con exactitud el papel que juega esta enzima en *S. capitis*, ya que no se han realizado estudios sobre ella. La mutación observada en SC35 se produce en el aminoácido 3, por lo que es muy probable que no afecte a la funcionalidad de la enzima y no contribuya a la aparición de la resistencia a daptomicina.

El gen *qacB*, de origen plasmídico, codifica un transportador de iones amonio que pertenece a la superfamilia DHA “Drug H⁺ Antiporter”, y se ha relacionado con la resistencia a las fluoroquinolonas (Nakaminami, Noguchi, & Sasatsu, 2010) y con niveles de baja resistencia a cationes divalentes (Hassan, Skurray, & Brown, 2007). El gen *qacA*, que pertenece a la misma familia que *qacB*, sí está relacionado con la resistencia de alto nivel a antimicrobianos catiónicos divalentes y monovalentes, y de manera muy curiosa,

DISCUSIÓN

su secuencia proteica solo difiere de la de QacB en 6 aminoácidos (Kumar & Varela, 2012). El centro activo de estas proteínas se encuentra en los aminoácidos 322 o 323 de la secuencia (Hassan et al., 2007), mientras que la mutación observada en SC35 se encuentra en la posición 106, por lo que parece no afectar a la funcionalidad del transportador. Además, la mutación observada tampoco se produce en los aminoácidos que difieren de la secuencia de *qacA*, claves para la resistencia de alto nivel a antimicrobianos catiónicos divalentes (Hassan et al., 2007; Nakaminami et al., 2010). No sabemos la implicación que puede tener en el fenotipo de resistencia de este aislado, pero puede ser que este cambio ayude al reconocimiento de los cationes divalentes, como el complejo Ca^{2+} -DAP, y favorezca su expulsión de la membrana.

La última mutación génica observada en SC35 se produce en un gen de función desconocida situado tras el gen *queH*, relacionado con la síntesis de queosina, un nucleótido derivado de la modificación de la guanina que solo se expresa en algunas bacterias, como *E. coli* (Zallot et al., 2017), y delante del gen *tetR*, perteneciente a la familia de importantes reguladores génicos del mismo nombre, capaz de conferir resistencia a tetraciclina (Ramos et al., 2005). Se desconoce si este gen de función desconocida tiene alguna relación con los genes de su entorno ya que no hay ninguna información acerca de él, por lo que tampoco se puede determinar si está implicado en la resistencia a daptomicina en SC35.

También se observó una mutación en la región intergénica de FapR, regulador de la transcripción de FASII, encargado de la síntesis de ácidos grasos (Albanesi & de Mendoza, 2016). La mutación observada en SC35 se encuentra lejos, más de 200 nucleótidos, de la región reguladora del gen, reconocida por la propia FapR (Schujman, Paoletti, Grossman, & de Mendoza, 2003), por lo que es probable que este cambio no afecte a su regulación y no sea importante para la resistencia al antibiótico. Ocurre lo mismo con la mutación en la zona intergénica *psf1/lipA_3*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

S. aureus

- 1.- Los altos niveles de LPG parecen relacionarse con la resistencia a daptomicina en *S. aureus*, siendo concomitante con la mutación P314L en MprF.
- 2.- La mutación P314L no es única en el cromosoma del aislado resistente estudiado, dado que también se observan mutaciones en otros genes como *purR* o la adhesina Emb.
- 3.- *S. aureus* no parece adaptar de manera rápida su composición lipídica a la presencia de daptomicina en el medio de cultivo, por lo que se considera que la resistencia al antibiótico es innata, muy probablemente relacionada con la existencia de altos niveles de LPG en la membrana, al descartarse la contribución de otros lípidos y variaciones en el grosor de la pared celular.

S. capitis

- 1.- La resistencia a daptomicina en *S. capitis* no está ligada a los niveles de LPG, sino a los de otros lípidos, notablemente, DPG, DAG y AGL, aunque estas variaciones no vienen acompañadas por mutaciones en genes relacionados con la síntesis de lípidos de membrana ni con el control de la homeostasis de la envoltura celular.
- 2.- Las variaciones genéticas entre *S. capitis* sensible a daptomicina y *S. capitis* resistente a este antibiótico son varias e inéditas hasta ahora, destacando entre ellas la encontrada en RnJ2 -Asp487Gly-, proteína del degradosoma de bacterias Gram-positivas. Otra interesante mutación afecta al gen *qacB*, que, aunque de origen plasmídico, se integra en el cromosoma de nuestros aislados de *S. capitis*.
- 3.- *S. capitis* parece no adaptar rápidamente su composición lipídica a la presencia de daptomicina en el medio de cultivo, por lo que se interpreta que la resistencia al antibiótico es innata, quizás dependiente de los lípidos de membrana y del grosor de la pared.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aisenbrey, Christopher, Marquette, Arnaud, & Bechinger, Burkhard. (2019). The mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides refined by novel concepts from biophysical investigations. In K. Matsuzaki (Ed.), *Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application* (pp. 33-64). Singapore: Springer Singapore.
- Al Hennawi, Hussam Eddin Talhat, Mahdi, Elham Mohammed, & Memish, Ziad A. (2019). Native valve *Staphylococcus capitis* infective endocarditis: a mini review. *Infection*. doi: 10.1007/s15010-019-01311-8
- Albanesi, Daniela, & de Mendoza, Diego. (2016). FapR: From Control of Membrane Lipid Homeostasis to a Biotechnological Tool. *Frontiers in molecular biosciences*, 3, 64-64. doi: 10.3389/fmolb.2016.00064
- Arrizubieta, María Jesús, Toledo-Arana, Alejandro, Amorena, Beatriz, Penadés, José R., & Lasa, Iñigo. (2004). Calcium inhibits bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 186(22), 7490-7498. doi: 10.1128/JB.186.22.7490-7498.2004
- Bæk, Kristoffer T., Thøgersen, Louise, Mogensen, René G., Mellergaard, Maiken, Thomsen, Line E., Petersen, Andreas, Skov, Søren, Cameron, David R., Peleg, Anton Y., & Frees, Dorte. (2015). Stepwise decrease in daptomycin susceptibility in clinical *Staphylococcus aureus* isolates associated with an initial mutation in *rpoB* and a compensatory inactivation of the *clpX* gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(11), 6983-6991. doi: 10.1128/AAC.01303-15
- Baltz, Richard H. (2009). Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(2), 144-151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.031>
- Barber, Katie E., Ireland, Cortney E., Bukavyn, Natalia, & Rybak, Michael J. (2014). Observation of "Seesaw Effect" with Vancomycin, Teicoplanin, Daptomycin and Ceftaroline in 150 Unique MRSA Strains. *Infectious Diseases and Therapy*, 3(1), 35-43. doi: 10.1007/s40121-014-0023-0
- Bayer, A. S., Schneider, T., & Sahl, H. G. (2013). Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann N Y Acad Sci*, 1277(1), 139-158. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06819.x

BIBLIOGRAFÍA

- Bayer, Arnold S., Mishra, Nagendra N., Chen, Liang, Kreiswirth, Barry N., Rubio, Aileen, & Yang, Soo-Jin. (2015). Frequency and Distribution of Single-Nucleotide Polymorphisms within *mprF* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates and Their Role in Cross-Resistance to Daptomycin and Host Defense Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *59*(8), 4930-4937. doi: 10.1128/AAC.00970-15
- Bayer, Arnold S., Mishra, Nagendra N., Cheung, Ambrose L., Rubio, Aileen, & Yang, Soo-Jin. (2016). Dysregulation of *mprF* and *dltABCD* expression among daptomycin-non-susceptible MRSA clinical isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *71*(8), 2100-2104. doi: 10.1093/jac/dkw142
- Bayer, Arnold S., Mishra, Nagendra N., Sakoulas, George, Nonejuie, Poochit, Nast, Cynthia C., Pogliano, Joseph, Chen, Kuan-Tsen, Ellison, Steven N., Yeaman, Michael R., & Yang, Soo-Jin. (2014). Heterogeneity of *mprF* sequences in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates: role in cross-resistance between daptomycin and host defense antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*(12), 7462-7467. doi: 10.1128/AAC.03422-14
- Bayer, M. G., Heinrichs, J. H., & Cheung, A. L. (1996). The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, *178*(15), 4563-4570. doi: 10.1128/jb.178.15.4563-4570.1996
- Becker, Karsten, Heilmann, Christine, & Peters, Georg. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, *27*(4), 870-926. doi: 10.1128/CMR.00109-13
- Beld, Joris, Lee, D. John, & Burkart, Michael D. (2015). Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. *Molecular bioSystems*, *11*(1), 38-59. doi: 10.1039/c4mb00443d
- Belousoff, Matthew J., Eyal, Zohar, Radjainia, Mazdak, Ahmed, Tofayel, Bamert, Rebecca S., Matzov, Donna, Bashan, Anat, Zimmerman, Ella, Mishra, Satabdi, Cameron, David, Elmlund, Hans, Peleg, Anton Y., Bhushan, Shashi, Lithgow, Trevor, & Yonath, Ada. (2017). Structural basis for linezolid binding site rearrangement in the *Staphylococcus aureus* ribosome. *mBio*, *8*(3), e00395-00317. doi: 10.1128/mBio.00395-17

BIBLIOGRAFÍA

- Beriashvili, D., Taylor, R., Kralt, B., Abu Mazen, N., Taylor, S. D., & Palmer, M. (2018). Mechanistic studies on the effect of membrane lipid acyl chain composition on daptomycin pore formation. *Chem Phys Lipids*, 216, 73-79. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2018.09.015
- Berti, Andrew D., Shukla, Neehal, Rottier, Aaron D., McCrone, J. Sue, Turner, Hannah M., Monk, Ian R., Baines, Sarah L., Howden, Benjamin P., Proctor, Richard A., & Rose, Warren E. (2018). Daptomycin selects for genetic and phenotypic adaptations leading to antibiotic tolerance in MRSA. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(8), 2030-2033. doi: 10.1093/jac/dky148
- Bi, Ruru, Qin, Tingting, Fan, Wenting, Ma, Ping, & Gu, Bing. (2018). The emerging problem of linezolid-resistant *enterococci*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 11-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.018>
- Boaretti, Marzia, Canepari, Pietro, Lleò, Maria del Mar, & Satta, Giuseppe. (1993). The activity of daptomycin on *Enterococcus faecium* protoplasts: indirect evidence supporting a novel mode of action on lipoteichoic acid synthesis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 31(2), 227-235. doi: 10.1093/jac/31.2.227
- Boudjemaa, Rym, Cabriel, Clément, Dubois-Brissonnet, Florence, Bourg, Nicolas, Dupuis, Guillaume, Gruss, Alexandra, Lévêque-Fort, Sandrine, Briandet, Romain, Fontaine-Aupart, Marie-Pierre, & Steenkeste, Karine. (2018). Impact of Bacterial Membrane Fatty Acid Composition on the Failure of Daptomycin To Kill *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(7), e00023-00018. doi: 10.1128/AAC.00023-18
- Bowler, P. G. (2018). Antibiotic resistance and biofilm tolerance: a combined threat in the treatment of chronic infections. *J Wound Care*, 27(5), 273-277. doi: 10.12968/jowc.2018.27.5.273
- Butin, M., Rasigade, J. P., Martins-Simões, P., Meugnier, H., Lemriss, H., Goering, R. V., Kearns, A., Deighton, M. A., Denis, O., Ibrahim, A., Claris, O., Vandenesch, F., Picaud, J. C., & Laurent, F. (2016). Wide geographical dissemination of the multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A clone in neonatal intensive-care units. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(1), 46-52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.09.008>

BIBLIOGRAFÍA

- Butin, Marine, Dumont, Yann, Rasigade, Jean-Philippe, Martins Simoes, Patricia, Hoden, Louise, Picaud, Jean-Charles, & Laurent, Frédéric. (2018). Chromogenic detection procedure for the multidrug-resistant, neonatal sepsis-associated clone *Staphylococcus capitis* NRCS-A. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90(2), 81-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.012>
- Butler, Mark S., Hansford, Karl A., Blaskovich, Mark A. T., Halai, Reena, & Cooper, Matthew A. (2014). Glycopeptide antibiotics: Back to the future. *The Journal Of Antibiotics*, 67, 631. doi: 10.1038/ja.2014.111
- Cafiso, Viviana, Bertuccio, Taschia, Purrello, Simona, Campanile, Floriana, Mammina, Caterina, Sartor, Assunta, Raglio, Annibale, & Stefani, Stefania. (2014). *dltA* overexpression: A strain-independent keystone of daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(1), 26-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.10.001>
- Cameron, D. R., Jiang, J. H., Hassan, K. A., Elbourne, L. D., Tuck, K. L., Paulsen, I. T., & Peleg, A. Y. (2015a). Insights on virulence from the complete genome of *Staphylococcus capitis*. *Front Microbiol*, 6, 980. doi: 10.3389/fmicb.2015.00980
- Cameron, David R., Howden, Benjamin P., & Peleg, Anton Y. (2011). The interface between antibiotic resistance and virulence in *Staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, 53(6), 576-582. doi: 10.1093/cid/cir473
- Cameron, David R., Mortin, Lawrence I., Rubio, Aileen, Mylonakis, Eleftherios, Moellering, Robert C., Eliopoulos, George M., & Peleg, Anton Y. (2015b). Impact of daptomycin resistance on *Staphylococcus aureus* virulence. *Virulence*, 6(2), 127-131. doi: 10.1080/21505594.2015.1011532
- Carter, Glen P., Ussher, James E., Da Silva, Anders Gonçalves, Baines, Sarah L., Heffernan, Helen, Riley, Thomas V., Broadbent, Roland, van der Linden, Antje, Lee, Jean, Monk, Ian R., Stinear, Timothy P., Howden, Benjamin P., & Williamson, Deborah A. (2018). Genomic analysis of multiresistant *Staphylococcus capitis* associated with neonatal sepsis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(11), e00898-00818. doi: 10.1128/AAC.00898-18

BIBLIOGRAFÍA

- Casey, A. L., Lambert, P. A., & Elliott, T. S. J. (2007). Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, S23-S32. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(07\)72175-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(07)72175-1)
- Clarke, Simon R., & Foster, Simon J. (2006). Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*. In R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 51, pp. 187-224): Academic Press.
- Cronan, John E., & Thomas, Jacob. (2009). Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods in enzymology*, 459, 395-433. doi: 10.1016/S0076-6879(09)04617-5
- Cui, Longzhu, Isii, Taisuke, Fukuda, Minoru, Ochiai, Tomonori, Neoh, Hui-min, Camargo, Ilana Lopes Baratella da Cunha, Watanabe, Yukiko, Shoji, Mitsutaka, Hishinuma, Tomomi, & Hiramatsu, Keiichi. (2010). An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 5222. doi: 10.1128/AAC.00437-10
- Chapot-Chartier, Marie-Pierre, & Kulakauskas, Saulius. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial cell factories*, 13 Suppl 1(Suppl 1), S9-S9. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9
- Chen, Yen-Fei, Sun, Tzu-Lin, Sun, Yen, & Huang, Huey W. (2014). Interaction of daptomycin with lipid bilayers: a lipid extracting effect. *Biochemistry*, 53(33), 5384-5392. doi: 10.1021/bi500779g
- Cheung, A. L., Bayer, M. G., & Heinrichs, J. H. (1997). *sar* Genetic determinants necessary for transcription of RNAll and RNAlll in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 179(12), 3963-3971. doi: 10.1128/jb.179.12.3963-3971.1997
- Chow, A., Win, N. N., Ng, P. Y., Lee, W., & Win, M. K. (2016). Vancomycin-resistant *enterococci* with reduced daptomycin susceptibility in Singapore: prevalence and associated factors. *Epidemiology and Infection*, 144(12), 2540-2545. doi: 10.1017/S0950268816000923
- Chu, Vivian H., Cabell, Christopher H., Abrutyn, Elias, Corey, G. Ralph, Hoen, Bruno, Miro, Jose M., Olaison, Lars, Stryjewski, Martin E., Pappas, Paul, Anstrom, Kevin J., Eykyn, Susannah, Habib, Gilbert, Benito, Natividad, Fowler, Vance G., Jr., & Group, The International Collaboration on Endocarditis Merged Database Study.

- (2004). Native Valve Endocarditis Due to Coagulase-Negative Staphylococci: Report of 99 Episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clinical Infectious Diseases*, 39(10), 1527-1530. doi: 10.1086/424878
- Davlieva, Milya, Zhang, Wanna, Arias, Cesar A., & Shamoo, Yousif. (2013). Biochemical characterization of cardiolipin synthase mutations associated with daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 289-296. doi: 10.1128/AAC.01743-12
- Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A. W., Bruggeman, C. A., & Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(3), 222-235. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01573.x
- Dosselaere, F., & Vanderleyden, J. (2001). A Metabolic Node in Action: Chorismate-Utilizing Enzymes in Microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 27(2), 75-131. doi: 10.1080/20014091096710
- Douros, Antonios, Grabowski, Katja, & Stahlmann, Ralf. (2015). Drug–drug interactions and safety of linezolid, tedizolid, and other oxazolidinones. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 11(12), 1849-1859. doi: 10.1517/17425255.2015.1098617
- Ehlersson, Gustaf, Hellmark, Bengt, Svartström, Olov, Stenmark, Bianca, & Söderquist, Bo. (2017). Phenotypic characterisation of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures in newborn infants, with a special focus on *Staphylococcus capitis*. *Acta Paediatrica*, 106(10), 1576-1582. doi: 10.1111/apa.13950
- Eichmann, Thomas Oliver, & Lass, Achim. (2015). DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol--stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72(20), 3931-3952. doi: 10.1007/s00018-015-1982-3
- Ericson, M. E., Subramanian, C., Frank, M. W., & Rock, C. O. (2017). Role of Fatty Acid Kinase in Cellular Lipid Homeostasis and SaeRS-Dependent Virulence Factor Expression in *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 8(4). doi: 10.1128/mBio.00988-17

BIBLIOGRAFÍA

- Ernst, Christoph M., & Peschel, Andreas. (2011). Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids. *Molecular Microbiology*, *80*(2), 290-299. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07576.x
- Ernst, Christoph M., & Peschel, Andreas. (2019). MprF-mediated daptomycin resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, *309*(5), 359-363. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.05.010>
- Ernst, Christoph M., Slavetinsky, Christoph J., Kuhn, Sebastian, Hauser, Janna N., Nega, Mulugeta, Mishra, Nagendra N., Gekeler, Cordula, Bayer, Arnold S., & Peschel, Andreas. (2018). Gain-of-Function Mutations in the Phospholipid Flippase MprF Confer Specific Daptomycin Resistance. *mBio*, *9*(6), e01659-01618. doi: 10.1128/mBio.01659-18
- Ernst, Christoph M., Staubitz, Petra, Mishra, Nagendra N., Yang, Soo-Jin, Hornig, Gabriele, Kalbacher, Hubert, Bayer, Arnold S., Kraus, Dirk, & Peschel, Andreas. (2009). The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS pathogens*, *5*(11), e1000660-e1000660. doi: 10.1371/journal.ppat.1000660
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST. (2019). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. from <http://www.eucast.org>
- Fariña, Norma, Carpinelli, Letizia, Samudio, Margarita, Guillén, Rosa, Laspina, Florentina, Sanabria, Ramona, Abente, Sonia, Rodas, Ladis, González, Pedro, & de Kaspar, Herminia M. (2013). *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos: Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista chilena de infectología*, *30*, 480-488.
- Foster, Timothy J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 430-449. doi: 10.1093/femsre/fux007
- Foster, Timothy J., Geoghegan, Joan A., Ganesh, Vannakambadi K., & Höök, Magnus. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews. Microbiology*, *12*(1), 49-62. doi: 10.1038/nrmicro3161

BIBLIOGRAFÍA

- Freiberg, Christoph, A Brunner, Nina, Schiffer, Guido, Lampe, Thomas, Pohlmann, Jens, Brands, Michael, Raabe, Martin, Häbich, Dieter, & Ziegelbauer, Karl. (2004). Identification and characterization of the first class of potent bacterial acetyl-CoA carboxylase inhibitors with antibacterial activity. *The Journal of biological chemistry*, 279, 26066-26073. doi: 10.1074/jbc.M402989200
- Fukuda, Seiji, Wada, Keisuke, Yasuda, Kenji, Iwasa, Junji, & Yamaguchi, Seiji. (2010). Acute osteomyelitis of the acetabulum induced by *Staphylococcus capitis* in a young athlete. *Pediatric reports*, 2(1), e2-e2. doi: 10.4081/pr.2010.e2
- García-Fernández, Esther, Koch, Gudrun, Wagner, Rabea M., Fekete, Agnes, Stengel, Stephanie T., Schneider, Johannes, Mielich-Süss, Benjamin, Geibel, Sebastian, Markert, Sebastian M., Stigloher, Christian, & Lopez, Daniel. (2017). Membrane microdomain disassembly inhibits MRSA antibiotic resistance. *Cell*, 171(6), 1354-1367.e1320. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.012>
- Gómez Casanova, Natalia, Siller Ruiz, María , & Muñoz Bellido, Juan Luis. (2017). Mechanism of resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Rev. Esp Quimioterap*, 30(6), 391-396.
- Gray, Declan Alan, & Wenzel, Michaela. (2020). More Than a Pore: A Current Perspective on the In Vivo Mode of Action of the Lipopeptide Antibiotic Daptomycin. *Antibiotics*, 9(1), 17.
- Grein, Fabian, Muller, Anna, Scherer, Katharina M., Liu, Xinliang, Ludwig, Kevin C., Klockner, Anna, Strach, Manuel, Sahl, Hans-Georg, Kubitscheck, Ulrich, & Schneider, Tanja. (2020). Ca²⁺-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids. *Nature communications*, 11(1), 1455. doi: 10.1038/s41467-020-15257-1
- Gründling, Angelika, & Schneewind, Olaf. (2007). Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), 8478-8483. doi: 10.1073/pnas.0701821104
- Guignard, Bertrand, Entenza, José M., & Moreillon, Philippe. (2005). β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(5), 479-489. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.06.002>

BIBLIOGRAFÍA

- Hagiya, H., Sugawara, Y., Kimura, K., Hamaguchi, S., Nishi, I., Hayashi, M., Akeda, Y., & Tomono, K. (2018). Emergence of daptomycin non-susceptible coagulase-negative *Staphylococci* in patients with cardiovascular device infections: Two cases report investigated by whole genome analysis. *Medicine (Baltimore)*, *97*(49), e13487. doi: 10.1097/md.00000000000013487
- Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, *41*(3), 276-301. doi: 10.1093/femsre/fux010
- Hashemian, Seyed Mohammad Reza, Farhadi, Tayebeh, & Ganjparvar, Mojdeh. (2018). Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug design, development and therapy*, *12*, 1759-1767. doi: 10.2147/DDDT.S164515
- Hassan, Karl A., Skurray, Ronald A., & Brown, Melissa H. (2007). Transmembrane helix 12 of the *Staphylococcus aureus* multidrug transporter QacA lines the bivalent cationic drug binding pocket. *Journal of bacteriology*, *189*(24), 9131-9134. doi: 10.1128/JB.01492-07
- Hauksson, Jón B., Rilfors, Leif, Lindblom, Göran, & Arvidson, Gösta. (1995). Structures of glucolipids from the membrane of *Acholeplasma laidlawii* strain A-EF22. III. Monoglucosyldiacylglycerol, diglucosyldiacylglycerol, and monoacyldiglucosyldiacylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1258*(1), 1-9. doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00074-M](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00074-M)
- Heidary, Mohsen, Khosravi, Azar Dohkt, Khoshnood, Saeed, Goudarzi, Mehdi, Nasiri, Mohammad Javad, & Soleimani, Saleh. (2017). Daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(1), 1-11. doi: 10.1093/jac/dkx349
- Heilmann, C., Ziebuhr, W., & Becker, K. (2018). Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology and Infection*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>
- Hernández Martí, V, Romá Sánchez, E, Salavert Lletí, M, Bosó Ribelles, V y Poveda Andrés, J.L. (2007). Daptomicina: revitalizando un antiguo fármaco ante la necesidad de nuevos agentes activos frente a bacterias grampositivas multirresistentes. *Rev. Esp Quimioterap*, *20* (Nº 3), 261-276.

BIBLIOGRAFÍA

- Hines, Kelly M, Shen, Tianwei, Ashford, Nathaniel K, Waalkes, Adam, Penewit, Kelsi, Holmes, Elizabeth A, McLean, Kathryn, Salipante, Stephen J, Werth, Brian J, & Xu, Libin. (2020). Occurrence of cross-resistance and β -lactam seesaw effect in glycopeptide-, lipopeptide- and lipoglycopeptide-resistant MRSA correlates with membrane phosphatidylglycerol levels. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi: 10.1093/jac/dkz562
- Hiramatsu, Keiichi, Aritaka, Nanae, Hanaki, Hideaki, Kawasaki, Shiori, Hosoda, Yasuyuki, Hori, Satoshi, Fukuchi, Yoshinosuke, & Kobayashi, Intetsu. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *The Lancet*, 350(9092), 1670-1673. doi: 10.1016/S0140-6736(97)07324-8
- Hiramatsu, Keiichi, Cui, Longzhu, Kuroda, Makoto, & Ito, Teruyo. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 9(10), 486-493. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02175-8
- Hong, S. I., Lee, Y. M., Park, K. H., Ryu, B. H., Hong, K. W., Kim, S., Bae, I. G., & Cho, O. H. (2019). Clinical and Molecular Characteristics of qacA- and qacB-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Causing Bloodstream Infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(4). doi: 10.1128/aac.02157-18
- Jiang, J. H., Dexter, C., Cameron, D. R., Monk, I. R., Baines, S. L., Abbott, I. J., Spelman, D. W., Kostoulias, X., Nethercott, C., Howden, B. P., & Peleg, A. Y. (2019a). Evolution of Daptomycin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci Involves Mutations of the Essential Two-Component Regulator WalkR. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(3). doi: 10.1128/aac.01926-18
- Jiang, Jih-Hang, Bhuiyan, Md Saruar, Shen, Hsin-Hui, Cameron, David R., Rupasinghe, Thusitha W. T., Wu, Chun-Ming, Le Brun, Anton P., Kostoulias, Xenia, Domene, Carmen, Fulcher, Alex J., McConville, Malcolm J., Howden, Benjamin P., Lieschke, Graham J., & Peleg, Anton Y. (2019b). Antibiotic resistance and host immune evasion in *Staphylococcus aureus* mediated by a metabolic adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(9), 3722. doi: 10.1073/pnas.1812066116
- Jousselin, Ambre, Manzano, Caroline, Biette, Alexandra, Reed, Patricia, Pinho, Mariana G., Rosato, Adriana E., Kelley, William L., & Renzoni, Adriana. (2016). The

BIBLIOGRAFÍA

- Staphylococcus aureus* chaperone PrsA is a new auxiliary factor of oxacillin resistance affecting penicillin-binding protein 2A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3), 1656. doi: 10.1128/AAC.02333-15
- Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological reviews*, 55(2), 288-302.
- Kang, Kyoung-Mi, Mishra, Nagendra N., Park, Kun Taek, Lee, Gi-Yong, Park, Yong Ho, Bayer, Arnold S., & Yang, Soo-Jin. (2017). Phenotypic and genotypic correlates of daptomycin-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 55(2), 153-159. doi: 10.1007/s12275-017-6509-1
- Khatib, Tala O., Stevenson, Heather, Yeaman, Michael R., Bayer, Arnold S., & Pokorny, Antje. (2016). Binding of daptomycin to anionic lipid vesicles is reduced in the presence of lysyl-phosphatidylglycerol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(8), 5051-5053. doi: 10.1128/AAC.00744-16
- Klevens, R. Monina, Morrison, Melissa A., Fridkin, Scott K., Reingold, Arthur, Petit, Susan, Gershman, Ken, Ray, Susan, Harrison, Lee H., Lynfield, Ruth, Dumyati, Ghinwa, Townes, John M., Craig, Allen S., Fosheim, Gregory, McDougal, Linda K., Tenover, Fred C., & Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program, Network. (2006). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerging infectious diseases*, 12(12), 1991-1993. doi: 10.3201/eid1212.060505
- Kloos, W E. (1980). Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annual Review of Microbiology*, 34(1), 559-592. doi: 10.1146/annurev.mi.34.100180.003015
- Kluytmans, J., van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*, 10(3), 505-520.
- Komaratat, P., & Kates, M. (1975). The lipid composition of a halotolerant species of *Staphylococcus epidermidis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 398(3), 464-484. doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(75\)90197-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(75)90197-6)
- Koprivnjak, T., Zhang, D., Ernst, C. M., Peschel, A., Nauseef, W. M., & Weiss, J. P. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* cardiolipin synthases 1 and 2 and their

BIBLIOGRAFÍA

- contribution to accumulation of cardiolipin in stationary phase and within phagocytes. *Journal of bacteriology*, 193(16), 4134-4142. doi: 10.1128/JB.00288-11
- Kreutzberger, Mark A., Pokorny, Antje, & Almeida, Paulo F. (2017). Daptomycin–phosphatidylglycerol domains in lipid membranes. *Langmuir*, 33(47), 13669-13679. doi: 10.1021/acs.langmuir.7b01841
- Kuhn, Sebastian, Slavetinsky, Christoph J., & Peschel, Andreas. (2015). Synthesis and function of phospholipids in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(2), 196-202. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.016>
- Kumar, Mohit. (2016). Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*, India, 2013–2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22 N^o9, 1666-1667. doi: DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2209.160044>
- Kumar, Rohit, Jangir, Pramod Kumar, Das, Jhumki, Taneja, Bhupesh, & Sharma, Rakesh. (2017). Genome analysis of *Staphylococcus capitis* TE8 reveals repertoire of antimicrobial peptides and adaptation strategies for growth on human skin. *Scientific reports*, 7(1), 10447-10447. doi: 10.1038/s41598-017-11020-7
- Kumar, S., & Varela, M. F. (2012). Biochemistry of bacterial multidrug efflux pumps. *Int J Mol Sci*, 13(4), 4484-4495. doi: 10.3390/ijms13044484
- Laganas, Valerie, Alder, Jeffrey, & Silverman, Jared A. (2003). In vitro bactericidal activities of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* are not mediated by inhibition of lipoteichoic acid biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2682-2684. doi: 10.1128/aac.47.8.2682-2684.2003
- Lakhundi, Sahreena, & Zhang, Kunyan. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00020-00018. doi: 10.1128/cmr.00020-18
- Laurent, F., & Butin, M. (2019). *Staphylococcus capitis* and NRCS-A clone: the story of an unrecognized pathogen in neonatal intensive care units. *Clin Microbiol Infect*. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.009
- Lazaris, Alexandros, Coleman, David C, Kearns, Angela M, Pichon, Bruno, Kinnevey, Peter M, Earls, Megan R, Boyle, Breida, O’Connell, Brian, Brennan, Gráinne I, & Shore,

BIBLIOGRAFÍA

- Anna C. (2017). Novel multiresistance cfr plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of cfr and optrA in VRE. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3252-3257. doi: 10.1093/jac/dkx292
- Lee, Grace C., Dallas, Steven D., Wang, Yufeng, Olsen, Randall J., Lawson, Kenneth A., Wilson, James, & Frei, Christopher R. (2017). Emerging multidrug resistance in community-associated *Staphylococcus aureus* involved in skin and soft tissue infections and nasal colonization. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, 2461-2468. doi: doi:10.1093/jac/dkx200
- Lemriss, H., Dumont, Y., Lemriss, S., Martins-Simoes, P., Butin, M., Lahlou, L., Rasigade, J. P., El Kabbaj, S., Laurent, F., & Ibrahimi, A. (2016). Genome sequences of multiresistant *Staphylococcus capitis* pulsotype NRCS-A and Methicillin-Susceptible *S. capitis* pulsotype NRCS-C. *Genome announcements*, 4(3), e00541-00516. doi: 10.1128/genomeA.00541-16
- Lister, Jessica L., & Horswill, Alexander R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 178-178. doi: 10.3389/fcimb.2014.00178
- Liu, J., Hicks, D. B., & Krulwich, T. A. (2013). Roles of Atpl and two YidC-type proteins from alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 in ATP synthase assembly and nonfermentative growth. *J Bacteriol*, 195(2), 220-230. doi: 10.1128/jb.01493-12
- López, Daniel, & Koch, Gudrun. (2017). Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview. *Current opinion in microbiology*, 36, 76-84. doi: 10.1016/j.mib.2017.02.001
- Lourtet-Hascoët, J., Félicé, M. P., Bicart-See, A., Bouige, A., Giordano, G., & Bonnet, E. (2018). Species and antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections. *Epidemiol Infect*, 146(14), 1771-1776. doi: 10.1017/s0950268818001437
- Lovering, Andrew L., Safadi, Susan S., & Strynadka, Natalie C.J. (2012). Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 451-478. doi: 10.1146/annurev-biochem-061809-112742

BIBLIOGRAFÍA

- Madigan, Michael T., Martinko, John M., Bender, Kelly S., Buckley, Daniel H., & Stahl, David A. (2014). *Brock biology of microorganisms*.
- Mak, P., Maszewska, A., & Rozalska, M. (2008). The amino acid sequences and activities of synergistic hemolysins from *Staphylococcus cohnii*. *FEMS Microbiol Lett*, 287(2), 230-235. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01321.x
- Malihe, Talebi, Mohammad, Shafiee, Javad, Sadeghi, Asghari, Moghadam Nasrin, Mahnaz, Saifi, & R., Pourshafie Mohammad. (2016). Genotypic diversity of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* isolated from inpatients and outpatients. *Microbial Drug Resistance*, 22(2), 147-154. doi: 10.1089/mdr.2014.0195
- McCallum, Nadine, Berger-Bächli, Brigitte, & Senn, Maria M. (2010). Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2), 118-129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.015>
- McGuinness, Will A., Malachowa, Natalia, & DeLeo, Frank R. (2017). Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus* *The Yale journal of biology and medicine*, 90(2), 269-281.
- Mechler, Lukas, Bonetti, Eve-Julie, Reichert, Sebastian, Flötenmeyer, Matthias, Schrenzel, Jacques, Bertram, Ralph, François, Patrice, & Götz, Friedrich. (2016). Daptomycin tolerance in the *Staphylococcus aureus* pitA6 mutant is due to upregulation of the *dlt* operon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(5), 2684-2691. doi: 10.1128/AAC.03022-15
- Mehraj, J., Witte, W., Akmatov, M. K., Layer, F., Werner, G., & Krause, G. (2016). Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal carriage patterns in the community. *Curr Top Microbiol Immunol*, 398, 55-87. doi: 10.1007/82_2016_497
- Mehta, Shrenik, Cuirolo, Arabela X., Plata, Konrad B., Riosa, Sarah, Silverman, Jared A., Rubio, Aileen, Rosato, Roberto R., & Rosato, Adriana E. (2012). VraSR two-component regulatory system contributes to mprF-mediated decreased susceptibility to daptomycin in in vivo-selected clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(1), 92-102. doi: 10.1128/AAC.00432-10
- Miller, Christopher R., Dey, Somrita, Smolenski, Paula D., Kulkarni, Pushkar S., Monk, Jonathan M., Szubin, Richard, Sakoulas, George, & Berti, Andrew D. (2020).

- Distinct Subpopulations of Intravalvular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Variable Susceptibility to Daptomycin in Tricuspid Valve Endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(3), e01593-01519. doi: 10.1128/AAC.01593-19
- Miller, William R., Bayer, Arnold S., & Arias, Cesar A. (2016). Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and *Enterococci*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(11), a026997. doi: 10.1101/cshperspect.a026997
- Mohammad, Majd, Nguyen, Minh-Thu, Engdahl, Cecilia, Na, Manli, Jarneborn, Anders, Hu, Zhicheng, Karlsson, Anna, Pullerits, Rille, Ali, Abukar, Götz, Friedrich, & Jin, Tao. (2019). The YIN and YANG of lipoproteins in developing and preventing infectious arthritis by *Staphylococcus aureus*. *PLoS pathogens*, 15(6), e1007877-e1007877. doi: 10.1371/journal.ppat.1007877
- Mohammed, Yasser Hussein Eissa, Manukumar, H. M., Rakesh, K. P., Karthik, C. S., Mallu, P., & Qin, Hua-Li. (2018). Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. *Microbial Pathogenesis*, 123, 339-347. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.002>
- Moise, Pamela A., North, Donald, Steenbergen, Judith N., & Sakoulas, George. (2009). Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(10), 617-624. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70200-2
- Moormeier, Derek E., & Bayles, Kenneth W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular microbiology*, 104(3), 365-376. doi: 10.1111/mmi.13634
- Morvan, Claire, Halpern, David, Kénanian, Gérald, Pathania, Amit, Anba-Mondoloni, Jamila, Lamberet, Gilles, Gruss, Alexandra, & Gloux, Karine. (2017). The *Staphylococcus aureus* FASII bypass escape route from FASII inhibitors. *Biochimie*, 141, 40-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.004>
- Müller, Anna, Grein, Fabian, Otto, Andreas, Gries, Kathrin, Orlov, Dmitriy, Zarubaev, Vladimir, Girard, Myriam, Sher, Xinwei, Shamova, Olga, Roemer, Terry, François, Patrice, Becher, Dörte, Schneider, Tanja, & Sahl, Hans-Georg. (2018). Differential daptomycin resistance development in *Staphylococcus aureus* strains with active

- and mutated *gra* regulatory systems. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(3), 335-348. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.12.002>
- Müller, Anna, Wenzel, Michaela, Strahl, Henrik, Grein, Fabian, Saaki, Terrens N. V., Kohl, Bastian, Siersma, Tjalling, Bandow, Julia E., Sahl, Hans-Georg, Schneider, Tanja, & Hamoen, Leendert W. (2016). Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(45), E7077-E7086. doi: 10.1073/pnas.1611173113
- Nakaminami, H., Noguchi, N., & Sasatsu, M. (2010). Fluoroquinolone efflux by the plasmid-mediated multidrug efflux pump QacB variant QacBIII in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(10), 4107-4111. doi: 10.1128/aac.01065-09
- Natsis, N. E., & Cohen, P. R. (2018). Coagulase-Negative Staphylococcus Skin and Soft Tissue Infections. *Am J Clin Dermatol*, 19(5), 671-677. doi: 10.1007/s40257-018-0362-9
- O'Donnell, A. G., Nahaie, M. R., Goodfellow, M., Minnikin, D. E., & Hájek, V. (1985). Numerical Analysis of Fatty Acid Profiles in the Identification of *Staphylococci*. *Microbiology*, 131(8), 2023-2033. doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-131-8-2023>
- Ohniwa, Ryosuke L., Kitabayashi, Kana, & Morikawa, Kazuya. (2013). Alternative cardiolipin synthase Cls1 compensates for stalled Cls2 function in *Staphylococcus aureus* under conditions of acute acid stress. *FEMS Microbiology Letters*, 338(2), 141-146. doi: 10.1111/1574-6968.12037
- Oliveira, W. F., Silva, P. M. S., Silva, R. C. S., Silva, G. M. M., Machado, G., Coelho, L. C. B., & Correia, M. T. S. (2018). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *Journal of Hospital Infection*, 98(2), 111-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>
- Otto, Michael. (2009). Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, 7(8), 555-567. doi: 10.1038/nrmicro2182
- Pader, Vera, Hakim, Sanika, Painter, Kimberley L., Wigneshweraraj, Sivaramesh, Clarke, Thomas B., & Edwards, Andrew M. (2016). *Staphylococcus aureus* inactivates

BIBLIOGRAFÍA

- daptomycin by releasing membrane phospholipids. *Nature Microbiology*, 2, 16194. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.194
- <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016194#supplementary-information>
- Parsons, Joshua B., Frank, Matthew W., Jackson, Pamela, Subramanian, Chitra, & Rock, Charles O. (2014). Incorporation of extracellular fatty acids by a fatty acid kinase-dependent pathway in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 92(2), 234-245. doi: 10.1111/mmi.12556
- Parsons, Joshua B., Frank, Matthew W., Subramanian, Chitra, Saenkham, Panatda, & Rock, Charles O. (2011). Metabolic basis for the differential susceptibility of Gram-positive pathogens to fatty acid synthesis inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15378. doi: 10.1073/pnas.1109208108
- Patiny, Luc, & Borel, Alain. (2013). ChemCalc: A building block for tomorrow's chemical infrastructure. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(5), 1223-1228. doi: 10.1021/ci300563h
- Paulander, Wilhelm, Varming, Anders Nissen, Bojer, Martin Saxtorph, Friberg, Cathrine, Bæk, Kristoffer, & Ingmer, Hanne. (2018). The agr quorum sensing system in *Staphylococcus aureus* cells mediates death of sub-population. *BMC research notes*, 11(1), 503-503. doi: 10.1186/s13104-018-3600-6
- Payne, David J., Warren, Patrick V., Holmes, David J., Ji, Yinduo, & Lonsdale, John T. (2001). Bacterial fatty-acid biosynthesis: a genomics-driven target for antibacterial drug discovery. *Drug Discovery Today*, 6(10), 537-544. doi: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)01774-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)01774-3)
- Pazos, Manuel, & Peters, Katharina. (2019). Peptidoglycan. In A. Kuhn (Ed.), *Bacterial Cell Walls and Membranes* (pp. 127-168). Cham: Springer International Publishing.
- Peleg, Anton Y., Miyakis, Spiros, Ward, Doyle V., Earl, Ashlee M., Rubio, Aileen, Cameron, David R., Pillai, Satish, Moellering, Robert C., Jr., & Eliopoulos, George M. (2012). Whole Genome Characterization of the Mechanisms of Daptomycin Resistance in Clinical and Laboratory Derived Isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE*, 7(1), e28316. doi: 10.1371/journal.pone.0028316

BIBLIOGRAFÍA

- Pelz, Alexandra, Wieland, Karsten-Peter, Putzbach, Karsten, Hentschel, Petra, Albert, Klaus, & Götz, Friedrich. (2005). Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32493-32498. doi: 10.1074/jbc.M505070200
- Pereira, Valeria Cataneli, Romero, Leticia Calixto, Pinheiro-Hubinger, Luiza, Oliveira, Adilson, Martins, Katheryne Benini, & Cunha, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da. (2020). Coagulase-negative *staphylococci*: a 20-year study on the antimicrobial resistance profile of blood culture isolates from a teaching hospital. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. doi: 10.1016/j.bjid.2020.01.003
- Pfaller, M. A., & Herwaldt, L. A. (1988). Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, 1(3), 281-299. doi: 10.1128/cmr.1.3.281
- Pogliano, Joe, Pogliano, Nicolas, & Silverman, Jared A. (2012). Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. *Journal of bacteriology*, 194(17), 4494-4504. doi: 10.1128/JB.00011-12
- Rajagopal, Mithila, & Walker, Suzanne. (2017). Envelope structures of Gram-positive bacteria. *Current topics in microbiology and immunology*, 404, 1-44. doi: 10.1007/82_2015_5021
- Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., & Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69(2), 326-356. doi: 10.1128/mnbr.69.2.326-356.2005
- Rashid, R., Cazenave-Gassiot, A., Gao, I. H., Nair, Z. J., Kumar, J. K., Gao, L., Kline, K. A., & Wenk, M. R. (2017). Comprehensive analysis of phospholipids and glycolipids in the opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*, 12(4), e0175886. doi: 10.1371/journal.pone.0175886
- Rashid, Rafi, & Kline, Kimberly A. (2017). Wrecking *Staphylococcus aureus* No Longer Unsinkable? *Cell Chemical Biology*, 24(7), 779-781. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.07.002

BIBLIOGRAFÍA

- Redder, P. (2018). Molecular and genetic interactions of the RNA degradation machineries in Firmicute bacteria. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 9(2). doi: 10.1002/wrna.1460
- Renzoni, A., Kelley, W. L., Rosato, R. R., Martinez, M. P., Roch, M., Fatouraei, M., Haeusser, D. P., Margolin, W., Fenn, S., Turner, R. D., Foster, S. J., & Rosato, A. E. (2017a). Molecular bases determining daptomycin resistance-mediated resensitization to beta-Lactams (Seesaw Effect) in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1). doi: 10.1128/aac.01634-16
- Renzoni, A., Von Dach, E., Landelle, C., Diene, S. M., Manzano, C., Gonzales, R., Abdelhady, W., Randall, C. P., Bonetti, E. J., Baud, D., O'Neill, A. J., Bayer, A., Cherkaoui, A., Schrenzel, J., Harbarth, S., & François, P. (2017b). Impact of Exposure of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Polyhexanide In Vitro and In Vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(10). doi: 10.1128/aac.00272-17
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 17(1), 208-212. doi: 10.1083/jcb.17.1.208
- Rincon, S., Panesso, D., Diaz, L., Carvajal, L. P., Reyes, J., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Resistance to "last resort" antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin era. *Biomedica*, 34, 191-208. doi: 10.7705/biomedica.v34i0.2210
- Rodriguez-Baño, Jesús, & Paterson, David L. (2006). A Change in the epidemiology of infections due to extended-spectrum β -lactamase—producing organisms. *Clinical Infectious Diseases*, 42(7), 935-937. doi: 10.1086/500945
- Rose, Warren E., Rybak, Michael J., Tsuji, Brian T., Kaatz, Glenn W., & Sakoulas, George. (2007). Correlation of vancomycin and daptomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* in reference to accessory gene regulator (agr) polymorphism and function. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1190-1193. doi: 10.1093/jac/dkm091
- Roy, Hervé, & Ibba, Michael. (2009). Broad range amino acid specificity of RNA-dependent lipid remodeling by multiple peptide resistance factors. *The Journal of biological chemistry*, 284(43), 29677-29683. doi: 10.1074/jbc.M109.046367

BIBLIOGRAFÍA

- Różalska, M., Derczyńska, A., & Maszewska, A. (2015). Synergistic hemolysins of coagulase-negative *staphylococci* (CoNS). *Acta Biochim Pol*, *62*(4), 757-764. doi: 10.18388/abp.2015_1126
- Saita, E., Albanesi, D., & de Mendoza, D. (2016). Sensing membrane thickness: Lessons learned from cold stress. *Biochim Biophys Acta*, *1861*(8 Pt B), 837-846. doi: 10.1016/j.bbaliip.2016.01.003
- Sakoulas, G., Moellering, R. C., Jr., & Eliopoulos, G. M. (2006). Adaptation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis*, *42 Suppl 1*, S40-50. doi: 10.1086/491713
- San-Juan, Rafael, Viedma, Esther, Chaves, Fernando, Lalueza, Antonio, Fortún, Jesús, Loza, Elena, Pujol, Miquel, Ardanuy, Carmen, Morales, Isabel, de Cueto, Marina, Resino-Foz, Elena, Morales-Cartagena, Alejandra, Rico, Alicia, Romero, María P., Orellana, María Ángeles, López-Medrano, Francisco, Fernández-Ruiz, Mario, & Aguado, José María. (2016). High MICs for vancomycin and daptomycin and complicated catheter-related bloodstream infections with methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*, *22*(6), 1057-1066. doi: 10.3201/eid2206.151709
- Santos-Beneit, Fernando, Ordóñez-Robles, María, & Martín, Juan F. (2017). Glycopeptide resistance: Links with inorganic phosphate metabolism and cell envelope stress. *Biochemical Pharmacology*, *133*, 74-85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.017>
- Sause, W. E., Balasubramanian, D., Irnov, I., Copin, R., Sullivan, M. J., Sommerfield, A., Chan, R., Dhabaria, A., Askenazi, M., Ueberheide, B., Shopsin, B., van Bakel, H., & Torres, V. J. (2019). The purine biosynthesis regulator PurR moonlights as a virulence regulator in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(27), 13563-13572. doi: 10.1073/pnas.1904280116
- Schneewind, Olaf, & Missiakas, Dominique. (2014). Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology*, *196*(6), 1133-1142. doi: 10.1128/JB.01155-13
- Schujman, Gustavo E., Paoletti, Luciana, Grossman, Alan D., & de Mendoza, Diego. (2003). FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of

BIBLIOGRAFÍA

- membrane lipid biosynthesis. *Developmental Cell*, 4(5), 663-672. doi: [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00123-0)
- Sewell, Edward W. C., & Brown, Eric D. (2013). Taking aim at wall teichoic acid synthesis: new biology and new leads for antibiotics. *The Journal Of Antibiotics*, 67, 43. doi: 10.1038/ja.2013.100
- Sierra, Josep M., Camoez, Mariana, Tubau, Fe, Gasch, Oriol, Pujol, Miquel, Martin, Rogelio, & Domínguez, M. Angeles. (2013). Low prevalence of Cfr-mediated linezolid resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital: case report on linezolid resistance acquired during linezolid therapy. *PLoS one*, 8(3), e59215-e59215. doi: 10.1371/journal.pone.0059215
- Singh, Manmilan, Chang, James, Coffman, Lauryn, & Kim, Sung Joon. (2017). Hidden mode of action of glycopeptide antibiotics: inhibition of wall teichoic acid biosynthesis. *The journal of physical chemistry. B*, 121(16), 3925-3932. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b00324
- Slavetinsky, Christoph, Kuhn, Sebastian, & Peschel, Andreas. (2017). Bacterial aminoacyl phospholipids – Biosynthesis and role in basic cellular processes and pathogenicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(11), 1310-1318. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.11.013>
- Song, Yang, Rubio, Aileen, Jayaswal, Radheshyam K., Silverman, Jared A., & Wilkinson, Brian J. (2013). Additional routes to *Staphylococcus aureus* daptomycin resistance as revealed by comparative genome sequencing, transcriptional profiling, and phenotypic studies. *PLoS one*, 8(3), e58469-e58469. doi: 10.1371/journal.pone.0058469
- Song, Yunjia, Lv, Yuan, Cui, Lanqing, Li, Yun, Ke, Qian, & Zhao, Yixuan. (2017). cfr-mediated linezolid-resistant clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, 1-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.09.008>
- Soo-Jin, Yang, N., Mishra Nagendra, Kyoung-Mi, Kang, Gi-Yong, Lee, Jong-Hwan, Park, & S., Bayer Arnold. (2018). Impact of Multiple Single-Nucleotide Polymorphisms Within mprF on Daptomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*, 24(8), 1075-1081. doi: 10.1089/mdr.2017.0156

BIBLIOGRAFÍA

- Speziale, Pietro, Pietrocola, Giampiero, Foster, Timothy J., & Geoghegan, Joan A. (2014). Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 171-171. doi: 10.3389/fcimb.2014.00171
- Stefani, Stefania, Campanile, Floriana, Santagati, Maria, Mezzatesta, Maria Lina, Cafiso, Viviana, & Pacini, Giovanni. (2015). Insights and clinical perspectives of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: A review of the available evidence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(3), 278-289. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.008>
- Suárez, Cristina, & Gudiol, Francesc. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Suresh, Maneesha K., Biswas, Raja, & Biswas, Lalitha. (2019). An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 309(1), 1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.11.002>
- Taglialegna, Agustina, Varela, Maria C., Rosato, Roberto R., & Rosato, Adriana E. (2019). VraSR and virulence trait modulation during daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *mSphere*, 4(1), e00557-00518. doi: 10.1128/mSphere.00557-18
- Tevell, S., Hellmark, B., Nilsson-Augustinsson, Å, & Söderquist, B. (2017). *Staphylococcus capitis* isolated from prosthetic joint infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 36(1), 115-122. doi: 10.1007/s10096-016-2777-7
- Thompson, Terissa A., & Brown, Paul D. (2017). Association between the *agr* locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model. *International Journal of Infectious Diseases*, 54, 72-76. doi: 10.1016/j.ijid.2016.11.411
- Tian, Yueru, Li, Tianming, Zhu, Yuanjun, Wang, Bei, Zou, Xue, & Li, Min. (2014). Mechanisms of linezolid resistance in *staphylococci* and *enterococci* isolated from two teaching hospitals in Shanghai, China. *BMC microbiology*, 14, 292-292. doi: 10.1186/s12866-014-0292-5

BIBLIOGRAFÍA

- Tong, Steven Y. C., Davis, Joshua S., Eichenberger, Emily, Holland, Thomas L., & Fowler, Vance G., Jr. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603-661. doi: 10.1128/CMR.00134-14
- Tran, Truc T., Munita, Jose M., & Arias, Cesar A. (2015). Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354, 32-53. doi: 10.1111/nyas.12948
- Valero-Guillén, P. L., Fernández-Natal, I., Marrodán-Ciordia, T., Tauch, A., & Soriano, F. (2016). Ether-linked lipids of *Dermabacter hominis*, a human skin actinobacterium. *Chem Phys Lipids*, 196, 24-32. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2016.02.002
- Venkatesan, N., Perumal, G., & Doble, M. (2015). Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol*, 10(11), 1743-1750. doi: 10.2217/fmb.15.69
- Vestergaard, Martin, Frees, Dorte, & Ingmer, Hanne. (2019). Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiology Spectrum*, 7(2). doi: doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018
- Vincent, P. Sandanayaka, & Amar, S. Prashad. (2002). Resistance to beta-lactam antibiotics: structure and mechanism based design of beta-lactamase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 9(12), 1145-1165. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867023370031>
- Vollmer, Waldemar, Blanot, Didier, & De Pedro, Miguel A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149-167. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
- Von Eiff, Christof, Becker, Karsten, Machka, Konstanze, Stammer, Holger, & Peters, Georg. (2001). Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *New England Journal of Medicine*, 344(1), 11-16. doi: 10.1056/NEJM200101043440102
- Werth, B. J., Jain, R., Hahn, A., Cummings, L., Weaver, T., Waalkes, A., Sengupta, D., Salipante, S. J., Rakita, R. M., & Butler-Wu, S. M. (2018). Emergence of dalbavancin non-susceptible, vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) after treatment of MRSA central line-associated bloodstream infection

BIBLIOGRAFÍA

- with a dalbavancin- and vancomycin-containing regimen. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(4), 429.e421-429.e425. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.028>
- White, D. C., & Frerman, F. E. (1968). Fatty acid composition of the complex lipids of *Staphylococcus aureus* during the formation of the membrane-bound electron transport system. *Journal of bacteriology*, 95(6), 2198-2209.
- Wu, S. W., & De Lencastre, H. (1999). Mrp--a new auxiliary gene essential for optimal expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist*, 5(1), 9-18. doi: 10.1089/mdr.1999.5.9
- Xia, Guoqing, Kohler, Thomas, & Peschel, Andreas. (2010). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2), 148-154. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.001>
- Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. *Cell Host Microbe*, 26(1), 15-21. doi: 10.1016/j.chom.2019.06.002
- Yao, Jiangwei, & Rock, Charles O. (2017). Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. *Biochimie*, 141, 30-39. doi: 10.1016/j.biochi.2017.06.015
- Yim, Grace, Thaker, Maulik N., Koteva, Kalinka, & Wright, Gerard. (2014). Glycopeptide antibiotic biosynthesis. *The Journal of Antibiotics*, 67(1), 31-41. doi: 10.1038/ja.2013.117
- Yin, Shaohui, Daum, Robert S., & Boyle-Vavra, Susan. (2006). VraSR two-component regulatory system and its role in induction of *pbp2* and *vraSR* expression by cell wall antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(1), 336-343. doi: 10.1128/AAC.50.1.336-343.2006
- Yoo, Jae Il, Kim, Jung Wook, Kang, Gi Su, Kim, Hwa Su, Yoo, Jung Sik, & Lee, Yeong Seon. (2013). Prevalence of amino acid changes in the *yvqF*, *vraSR*, *graSR*, and *tcaRAB* genes from vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology*, 51(2), 160-165. doi: 10.1007/s12275-013-3088-7
- Zallot, R., Ross, R., Chen, W. H., Bruner, S. D., Limbach, P. A., & de Crécy-Lagard, V. (2017). Identification of a Novel Epoxyqueuosine Reductase Family by

BIBLIOGRAFÍA

- Comparative Genomics. *ACS Chem Biol*, 12(3), 844-851. doi: 10.1021/acschembio.6b01100
- Zhan, Xiao-Yong, & Zhu, Qing-Yi. (2018). Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Evidence of positive selection in a penicillin-binding protein (PBP) 2a coding gene *mecA*. *Infection, Genetics and Evolution*, 59, 16-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.01.018>
- Zhang, TianHua, Muraih, Jawad K., Tishbi, Nasim, Herskowitz, Jennifer, Victor, Rachel L., Silverman, Jared, Uwumarenogie, Stephanie, Taylor, Scott D., Palmer, Michael, & Mintzer, Evan. (2014). Cardiolipin prevents membrane translocation and permeabilization by daptomycin. *The Journal of biological chemistry*, 289(17), 11584-11591. doi: 10.1074/jbc.M114.554444
- Zhang, Y.M, & Rock, Charles O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 222. doi: 10.1038/nrmicro1839
- Zhang, Zheng, Schwartz, Scott, Wagner, Lukas, & Miller, Webb. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2), 203-214. doi: 10.1089/10665270050081478

APÉNDICE

Secuencias de aminoácidos de los genes mutados en SA2

mprF

MNQEVKNKIFSIKITFATALFIFVAITLYRELSGINFKDTLVEFSKINRMSLVLLFIGGGASLVILSMYDVILSRALKMDISLG
 KVLRSYIINALNAIVGFGGFIGAGVRAMVYKNYTHDKKKLVHFISLILISMLTGLSLLSLLIVFHVFDASLILDKITWVRWV
 LYVVSFFLPLFIIYSMVRPPDKNNRFVGLYCTLVSCVEWLA AAVVLYFCGVIVDAHVSFMSFIAIFIAALSGLVSFIPGGFG
 AFDLVLLGFKTLGVPEEKVLLMLLLYRFAYYFVPIIALILSSFEFGTSAKKYIEGSKYFILAKDVTSLMSYQKDIIAKIPSL
 AILVFFTSMIFFVNNLTIVYDALYDGNHLTYIILLAIHTSACL LLLN VVG IYKQSRRAIFAMISILLITVATFFTYASYILITWL
 AIFVLLIVAFRRARRLKRPMRMRNIVAMLLFSLFILYVNHIFIA GTLYALDIYTIEMHTSVLRYYFWLTILIIAIIIGMIAWLFD
 YQFSKVRISSKIEDCEEIINQYGGNYLSHLIYSGDKQFFT NENKTAFLMYRYKASSLVVLGDPLGDENAFDELLEAFYNYAE
 YLGYDVIFYQVTDQHMPLYHNFNGQFFKLGEEAIDLTQFSTSGKKRRGFRATLNKFDELNISFEIIEPPFSTEFINELQHVS
 DLWLDNRQEMHFSVQGQFNEEYLSKAPIGVMRNEENEVIAFCSLMPTYFNDAISVDLIRWLP ELDLPLMDGLYLHMLL
 WSKEQGYTKFNMGMATLSNVGQLHYSYLRERLAGRVFEHFNGLYRFQGLRRYKSKYNPNWEPFLVYRKDNSLWESL
 SKVMR VIRHK

SA2	S A K K Y I E G S K Y F I L A K D V T S F L M S Y Q K D I I A K I P S L S L A I L V F F T S M I F F V N N L T I V Y D A	360
Referencia	S A K K Y I E G S K Y F I P A K D V T S F L M S Y Q K D I I A K I P S L S L A I L V F F T S M I F F V N N L T I V Y D A	360
SA1	S A K K Y I E G S K Y F I P A K D V T S F L M S Y Q K D I I A K I P S L S L A I L V F F T S M I F F V N N L T I V Y D A	360

Figura 49. Mutación en *mprF* de SA2 con respecto a SA1 y la cepa de referencia

purR

MRYKR SERIVFMTQYLMNHPNKLIPLTFFVKKFKQAKSSISEDVQI IKNTFQKEKLGTVITTAGASGGV TYKPMMSKEEA
 TEVVNEVITLLEEKERLLPGGYLFLSDLVGNPSLLNKVGLIASIYMEEKLD AVVTIATKGISLANAVANILNLPVVIRKDN
 KVTEGSTVSIN YVSGSSRKIETMVLSKR TLAENSNLVVDDFM RAGGSINGVMNLMNEFKAHVKGVSVLVESKEVKQR
 LIEDYTSLVKLSDVDEYNQEFNVEPGNSLSKFS

Ehbh1

MQRLESAIANKDQTKASENYIDADPTKKTAFD NAITQAESYLNKDHGTNKDKQAVEQAIQSVTSTENALNGDANLQCA
 KTEATQAIDNLTQLNTPQKTALKQQVNA AQRVSGVTDLKN SATSLNNAMDQLKQAIGDHD TIVAGGNYTNASPDKQ
 GAYTDAYNAAKNIVNGSPNVITNAADVTAATQRVNNAETSLNGDTNLATAKQQA KDALRQ MTHLSDAQQSITGQI
 DSATQVTGVQSVKDNATNLDNAMNQLRNSIANKDEVKASQPYVDADTDKQNA YNTAVTSAENIINATSQPTLDPSAV
 TQAAANQVNTNKTALNGAQLNANKKQETTANINRLSHLNNAQKQDLNTQVTNAPNISTVNQVKTKAEQLDQAMERLI
 NGIQDKDQVKQSVNFTDADPEKQTAYNN AVTAAENIINQANGTNANQSQVEAALSTVTTTKQALNGDRKVTDAKNN
 ANQTLSTLDNLNNAQKGA VTGNINQAHTVAEV TQAIQTAQELNTAMGNLKNLNDKDTTLG SQNFADADPEKKNAY
 NEAVRNAENILNKSTGTNVPK DQVEAAMNQVNTTKAALNGTQNLEKAKQHANT AIDGLSHLTNAQKEALKQLVQQS
 TTVAEAQNEQKANNVDAAMD KLRQSIADNATTKQNQNYTDASPNKKDAYNNAVTTAQGIIDQTTNPSLDPTVINQ
 AAGQVSTSKNALNGNENLEAAKQ QATQSLGSLDNLNNAQKQAVTNQINGAHTVDEANQIKQNAQNLNTAMGNLK

APÉNDICE

QAIADKDATKATVNFDDADQAKQQAYNTAVTNAENIISKANGGNATQTEVEQAIQQVNAAKQALNGNANVQHAKD
EATALINNSNDLNQAQKDALKQQVQNATTVAGVNNVKQTAQELNNAMTQLKQGIADKEQTKADGNFVNADSDKQ
NAYNQAVAKAEALISGTPDVPVVPSEITAALNKVTOAKNDLNGNTNLATAKQNVQHAIDQLPPLNQAQRDEYSKQIT
QATLVPNVNAIQQAATTLNDAMTQLKQGIANKAQIKGSENYHDADTDKQTAYDNAVTKAEELLKQTTNPTMDPNTI
QQALTKVNDTNQALNGNQKLADAKQDAKTTGLTDLHLNDAQKQALTTQVEQAPDIATVNNVKQNAQNLNNAMTN
LNNALQDKTETLNSINFTDADQAKKDDYTNVSHAEGILSKANGSNASQTEVEQAMQRVNEAKQALNGNDNVQRAK
DAAKQVITNANDLNQAQKDALKQQVDAAQTVANVNTIKQTAQDLNQAMTQLKQGIADKQTKANGFVNAYTDK
QNAYNNAVAHAEQIISGTPNANVDPQQVAQALQQVNQAKGDLNGNHNLQVAKDNANTAIQDLPPLNQPKTALK
DQVSHAELVTGVNAIKQNADALNNAMGTLKQQIQANSQVPQSVDFDQADQDKQQAYNNAANQAQQIANGTPTPV
LAPDVTVKAVTTMNAKDALNGDEKLAQAKQDALANLDTLRDLNQPRDALRNQINQAQALATVEQTKQNAQNVN
TAMGNLQKGIANKDAVKASENYHDADVDKQTAYTNVSAEQEIIINQTTNPTLNPDDITRALQVTDKAKNSLNGEAKL
ATEKQNAKDAVSGMTHLNDQKQALKGQIDQSPEIATVNQVKQTATSLDQAMDQLSQAINDKDQILADGNYLNAD
PDKQNAYKQAVAKAEALLNKQSGTNEVQAQVESITNEVNAAKQALNGNDNLANAKQQAKQQLANLTHLNDQKQS
FESQITQAPLVTDVTTINQKAQTLDHAMELLRNSVADNQTTLASEDYHDATAQRQNDYNKAVTAANNIINQTTSPM
NPDDVNGATTQVNNTKVALDGDENLAAAKQQANNRLDQLDHLNNAQKQQLSQITQSSDIAAVNGHKQTAESLNT
AMGNLINAIAHDQAVEQQRGNFINADTDKQTAYNTAVNEAAAMINKQTGQANQTEVEQAITKVQTTLQALNGDHN
LQVAKTNATQAI DALTS LNDPQKTALKDQVTAATLVAVHQIEQNANTLNQAMHGLRQSIQD NAATKANSKYINEDQ
PEQQNYDQAVQAANNIINEQTATLDNNAINQVAATVNTTKAALHGDVVKLQNDKDHAKQTVSQLAHLNNAQKHME
DTLIDSETTRTAVKQDLTEVQALDQLMDALQQSIADKDATRASSAYVNAEPNKKQAYDEAVQNAESIAGLNNPTINKG
NVSSATQAVISSKNALDGVVERLAQDKQTAGNSLNHL DQLTPAQQALENQINNATTRDKVAEIIAQAQALNEAMKAL
KESIKDQPQTEASSKFINEQQAQKDAYTQAVQHAKDLINKTTDPTLAKSIIDQATQAVTDAKNNLHGDQKLAQDKQRA
TETLNNLSNLNTPQRQALENQINNAATRGEVAQKLTEAALNQAMEALRNSIQDQQQTESGSKFINEDKPKQDAYQA
AVQNAKDLINQTNPTLDKAQVEQLTHAFKQAKDNLHGDQKLADDKQHAVTDLNQLNGLNPNPQROALESQINNAA
TRGEVAQKLAEAKALDQAMQALRNSIQDQQQTEAGSKFINEDKPKQDAYQAAVQNAKDLINQTNPTLDKSQVEQL
TQAVTTAKDNLHGDQKLARDQQQAVTTVNALPPLNHAQQQTLTDAINAAPTRTEVAQHVQTATELDHAMETLKNK
VDQVNTDKAQPNYEASTDKKEAVDQALQAAQSITDPTNGSNANKDAVEQALTKLQEKVNELNERNVAEAKTQAK
QTIDQLTHLNADQIATAKQNIQATKLPQIAELVDQATQLNQSMQQLQAVNEHANVEQTIDYTQADSDKQKAYKQ
AIADAENVLKQNAKQVQDQALQNLNAKQALNGDERVALAKTNGKHDIDQLNALNNAQQDGFKGRIDQSNLDLNI
QQIVDEAKALNRAMDQLSQEITGNEGRTKGSTNYVNADTQVKQVYDEAVDKAKQALDKSSGQNLTAEQVIKLNDAV
TAAKKALNGEERLNNRKAELQRLDQLTHLNNARQLAIQQINNAETLNKASRAINRATKLDNAMGAVQQYIDEQHL
GVISSTNYINADDNLKANYDNAIAANAHELDKVQGNIAKAEAEQLKQNIIDAQNALNGDQNLANAKDKANAFVNSL
NGLNQQQDLAHLKAINNADTVSDVTDIVNNQIDLNDAMETLKHLDVNEIPNAEQTVNYQNADDAKTNFDDAKRL
ANTLLNSDNTNVNDINGAIQAVNDAIHNLNGDQRLQDAKDKAIQSINQALANKLKEIASNATDQDKLIAKNKAEELA
NSIINNINKATSNAQVSVQTAGNHAIEQVHANEIPKAKIDANKDVKQVQALIDEIDRNPPLTDKEKQALKDRINQIL
QQGHNDINNALTKEEIEQAKAQLAALKEIKDLVKAKENAKQDVKQVQALIDEIDQNPPLTDKEKQALKDRINQILQ
QGHNDINNAMTKEEIEQAKAQLAALQDIKDLVKAKEDAKNAIKALANAKRDQINSNPDLTPEQKAKALKEIDEAEKR
ALQNVENAQTIDQLNRGLNLGLDDIRNTHVWEVDEQPAVNEIFEATPEQILVNGELIVHRDDIITEQDILAHINLIDQLSA
EVIDTPSTATISDSLTAKEVTTLLDGSKVIVNVPVKVVEKELSVVKQQAIESIENAAQQKIDEINNSVTLTLEQKEAAIAEVN

APÉNDICE

KLKQQAIDHVNAPDVHSVEEIQQQEQAYIEQFNPEQFTIEQAKSNAIKSIEDAIQHMIDEIKARTDLTDKEKQEAIKL
NQLKEQAIQAIQRAQSISEITEQLEQFKAQMKAANPTAKELAKRQKQEAISRIKDFSNEKINSIRNSEIGTADEKQAAMNQI
NEIVLETIRDINNAHTLQQVEAALNNGIARISAVQIVISDRAKQSSSTGNESNSHLTIGYGTANHPFNSSTIGHKKKLEDED
DDIDPLHMRHFSNFGNVIKNAIGVVGISGLLASFWFFIAKRRRKEDEEELEIRDNNKDSIKETLDDTKHLPLLFKRRR
KEDEEDVTVEEKDSLNNGESLDKVKHTPFFLPKRRRKEDEEDVEVTNENTDEKVLKDNEHSPLLFKRRRKEEDVETTT
SIESKDEDVPLLLAKKKQKDNQSKDKKSASKNTSKKVAKKKKKKSKKKNK

Secuencias de aminoácidos de los genes mutados en SC35

tlyC

MIVSIIILFLVSFFFSGSETALTAANRTKFQTAANKGDRKAKGLSKLLDKPNEFITLIVNNVANIILPILVAILAIRKGVNIVV
ASVIIIILILISEVPKSIAATFPDQISRLVYPIINILVILKIPITFVLNKM TDGINHLFSRGPVEKRFKSKEIRTLLNIAGREGAFN
EVENARLQNVMDFEKLIKTDVDTTPRVKVVAFSKEVTYDEAYETVMNEPYTRYPVYDEDIYDIIGVFHSHKYLAWSKHKD
DKITNYASSPLFVNEHNRAEWWLRKMTVTRKHLAIVLDEYGGTDAIVSHEDLIEELLGMEIEDEMDEQEEEEKLNQRLP
QSMKGR

dhbC

MAVNVKEEDIVDKLYASTKDWVSVETELNRTIDPSTLFYLTEQDAGDRFYMLNDNHSSYFGYHAVQRFKNNFENKQS
IFKEWENLKNEIELIHPNTSQHHLRLCGGFQFSSHKSDDREWREYGLNHFVLPKVLISIEGDRTFITYTTERQDFNIETFKEV
VSYFENTEVENETEDSLGDVTRVEDIYKDDWRELVEEAIETIDETKKIVLARRRRIKFNKDINIPYVLNQLKNEKNSYMFLL
ESNQSIFFSQTPPEQLIKVQDGVLSTKAVAGTIKRSHNEVEDEANIKAFKDKKNLGEHQFVVESILNDIKPFVQDVEYNET
PNILKNDHLYHLYTEIKGHLNEKSYIGLIDCLHPTPALGGYPKDEALEFIENKEFGTRGLYGPVGFIDVYDDCEFIVAIRSM
LIKGDQATLFAAGCIVKNSDPDSEVAETAVKFSPMMNALGVDNYDKS

Rnj2

MDGSLFIGGNILSIKKKNKDIRIIPGGVGEIAKNMYIVEVDDEMFLDAGLMFPEDEMLGVDIVIPDIQYVIENKDKLK
GIFLSHGHEHAIGAVSYILEQIDAPVYGSKLTIALIKENMKARNIKKKVRYTVSHDSVMKFKNVNVSFFNTTHSIPDSLGI
CIHTSYGSIVYTGEFKFDQSLHGQYAPDMKRMAEIGDEGVFALISDSTEAEKPGYNTPENVIEHHMYDAFTKVKGR LIVS
CYASNFIRIQQLNIASKLNRKVSFLGRSLESSFNARKMGYFDIPKDLLIPINEVDNYPKNEVIIIATGMQGEPEALSQM
AQKHKIMNIEEGDSVFLAITASANMEVIIADTLNELVRAGAHIPNNKKIHASSHGCMELKMMMLNIMKPEYFIPVQGE
FKMQIAHAKLAAESGVAPEKIFLVEKGDVINYNGKDMVLNEKVNNGVNLIDGIGVGDVGNIVLRDRHLLAEDGIFIAVV
TLGPKNRRRIAAGPEIQSRGFVYVRESEELLNEAEEKVRTIVEAGLQEKRIEWSEIKQNM RDQISKLLFESTKRRPMIIPVISE

I
referencia IAVVTLDPKNRRRIAAGPEIQSRGFVYVRESEELLNEAEEKVRTIVEAGLQEKRIEWSEIK 529
sc32 IAVVTLDPKNRRRIAAGPEIQSRGFVYVRESEELLNEAEEKVRTIVEAGLQEKRIEWSEIK 548
SC35 IAVVTLDPKNRRRIAAGPEIQSRGFVYVRESEELLNEAEEKVRTIVEAGLQEKRIEWSEIK 548

Figura 50. Mutación de *rnj2* en SC35 con respecto a SC32 y la cepa de referencia

APÉNDICE

qacB

MISFFTKTTDMMTSKKRWTALVVLAVSLFVVTMDMTILIMALPELVRELEPSGTQQLWIVDIYSLVLAGFIIPLSAFADK
WGRKKALLTGFALFGLVSLAIFFAENAFAEFVIAIRFLLGIAGALIMXTTLSMIRVIFENPKERATALAVWSIVSSIGAVFGPIIG
GALLDQFSWHS AFLINVPFTIIVVAGLFLLPESKLSKEKSHSWDIPSTILSIAGMIGLVWSIKEFSKEGLADIIPWVVIVLAI
TMIVIVKRNLS SSSDPMLDVRLFKKRSFSAGTIAAFMTMFAMTSVLLASQWLQVVEELSPFKAGLYLLPMAIGDMVFA
PIAPGLAARFGPXIVLPSGIGIAAIGMFIMYFFGHPLSYSTMALALILVGAGTASLAVASALIMLETPTSKAGNAAVEES
MYDLGNVFGVAVLGSLSSMLYRVFLDISFSSKGIVGDLAHVAEESVVGAVEVAKATGIKQLANEAVTSFNDAFVATAL
VGGIIMIIISIVVYLLIPKSLDITKQK

referencia	DIYSLVLAGFIIPLSAFADKWGRKKALLTGFALFGLVSLAIFFAE SAEFVIAIRFLLGIA	120
SC32	DIYSLVLAGFIIPLSAFADKWGRKKALLTGFALFGLVSLAIFFAE SAEFVIAIRFLLGIA	120
SC35	DIYSLVLAGFIIPLSAFADKWGRKKALLTGFALFGLVSLAIFFAE NAEFVIAIRFLLGIA	120

Figura 51. Mutación de *qacB* en SC35 con respecto a SC32 y la cepa de referencia

Cadena I de ATP sintasa

MSRFYIIFKQYIQYYLLIVLIGILYLIIPRPFILGLMIGTCGSLVNTYIFESYLAKAQQQDAIHISTGNIWRYLVIIACLWFF
FKDHINIIGVLIGLMISYIVILRPLLKRE