



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

*Infecciones respiratorias por  
Staphylococcus aureus: implicación clínica  
de factores de virulencia y persistencia*

Meissiner Gomes Fernandes





Universitat Autònoma de Barcelona

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**Departament de Genètica i Microbiologia**  
**Facultat de Biociències**

*Infecciones respiratorias por Staphylococcus aureus: implicación  
clínica de factores de virulencia y persistencia*

**Memoria presentada por Meissiner Gomes Fernandes  
para optar al grado de Doctora en Microbiología  
por la Universitat Autònoma de Barcelona.**

Vist-i-plau de les directores de la tesi

Dra. Cristina Prat Aymerich

Dra. Alicia Lacoma de la Torre

Dr. Daniel Yero



# ÍNDICE

---

ARTÍCULOS GENERADOS EN ESTA TESIS.....	8
RESUMEN .....	9
SUMMARY .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	13
LISTA DE TABLAS.....	16
LISTA DE FIGURAS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	20
1.1 Estructura del tracto respiratorio.....	20
1.2 La microbiota y el microbioma del tracto respiratorio .....	21
1.3 Interacción hospedador y microbiota residente: concepto colonización-infección .....	22
1.4 Infecciones del tracto respiratorio inferior .....	23
1.5 <i>Staphylococcus aureus</i> : descripción del género y características generales .....	27
1.5.1 Epidemiología .....	28
1.5.2 Estructura y factores de virulencia .....	29
1.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : descripción del género y características generales .....	31
1.6.1 Epidemiología .....	32
1.6.2 Factores de virulencia .....	32
1.7 Mecanismos de adaptación al tracto respiratorio inferior .....	33
1.7.1 Formación de <i>Biofilms</i> .....	34
1.7.2 Persistencia bacteriana.....	36
1.8 Sistemas de regulación mediados por la percepción del quorum ( <i>Quorum Sensing</i> ) .....	37
1.8.1 Sistema regulador de dos componentes Agr.....	40
1.8.1.1 Alelos del locus <i>agr</i> : actividad del AIP.....	42
1.8.1.2 Regulación del sistema Agr .....	44
1.8.1.3 Funcionalidad del sistema Agr .....	44
1.8.1.4 Implicaciones clínicas del sistema Agr .....	46
1.8.2 QS en <i>P. aeruginosa</i> .....	48
1.9 Relaciones interespecies entre <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> .....	50
JUSTIFICACIÓN.....	51
OBJETIVOS .....	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
4.1 Selección de pacientes y recogida de muestras.....	54
4.1.1 Definiciones .....	55
4.2 Procesamiento de las muestras.....	56

4.3	Cepas de estudio .....	56
4.4	Caracterización fenotípica: Resistencia a antibióticos .....	59
4.5	Caracterización genotípica de <i>S. aureus</i> .....	60
4.6	Determinación de la funcionalidad del Sistema Agr .....	62
4.6.1	Prueba de CAMP .....	62
4.6.2	Test de lisis de vesículas (VLT) .....	63
4.7	Transcripción reversa y PCR cuantitativa para el gen <i>rnalIII</i> de <i>S. aureus</i> .....	64
4.8	Optimización de las condiciones de cultivo.....	65
4.9	Curvas de crecimiento bacteriano.....	65
4.10	Ensayos de formación de <i>biofilm</i> .....	66
4.10.1	Formación de <i>biofilm</i> en placas de microdilución .....	66
4.10.2	Ensayo de formación de <i>biofilm</i> cruzado.....	67
4.10.3	Estudio de la morfología del <i>biofilm</i> en cultivo estático.....	68
4.10.4	Ensayos de <i>biofilm</i> en flujo dinámico .....	69
4.11	Bioensayo para detectar AHLs mediante cepa biosensora .....	70
4.12	Transcripción reversa y PCR cuantitativa para el gen <i>rnalIII</i> de <i>S. aureus</i> en presencia del sobrenadante de <i>P. aeruginosa</i> .....	71
4.13	Transcripción reversa y PCR cuantitativa para el estudio de la expresión de los sistemas QS <i>pqs</i> de <i>P. aeruginosa</i> y <i>agr</i> de <i>S. aureus</i> en medio ASM modificado. ....	72
4.14	Métodos estadísticos.....	72
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
5.1	Influencia de los factores del microorganismo y del hospedador en el aislamiento persistente de <i>S. aureus</i> , y en la evolución clínica de pacientes sometidos a ventilación mecánica (Objetivo 1) 74	
5.1.1	Características clínicas y epidemiológicas en función del grupo de estudio y de la evolución clínica .....	74
5.1.2	Características genotípicas de las cepas en función del grupo de estudio y de la evolución clínica .....	78
5.1.3	Aislamiento persistente de <i>S. aureus</i> en muestra respiratoria: características clínicas y microbiológicas.....	82
5.2	Importancia clínica del sistema Agr y su implicación en la adaptación de <i>S. aureus</i> al tracto respiratorio (Objetivo 2) .....	87
5.2.1	Caracterización de las cepas clínicas y los grupos de estudio .....	87
5.2.2	Funcionalidad del sistema Agr .....	88
5.2.3	Correlación entre la funcionalidad del Agr y las variables clínicas: aislamiento persistente y pronóstico clínico .....	93
5.2.4	Correlación entre la funcionalidad del sistema Agr y características genotípicas y fenotípicas de los aislados clínicos.....	96
5.2.5	Correlación entre la funcionalidad del sistema Agr y la formación de <i>biofilm</i> .....	101

5.3	Relaciones interespecíficas entre <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> : influencia en el desarrollo de fenotipos de virulencia relacionados con la actividad <i>quorum sensing</i> (Objetivo 3).....	105
5.3.1	Estudio de co-aislados clínicos de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> .....	105
5.3.1.1	Caracterización fenotípica y genotípica de los co- aislados clínicos .....	105
5.3.1.2	Influencia de las relaciones interespecies en el crecimiento planctónico y en la formación de <i>biofilm</i> .....	107
5.3.1.3	Estudio de la estructura de los <i>biofilms</i> formados por las cepas co-aisladas de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> . .....	111
5.3.1.4	Influencia de <i>P. aeruginosa</i> sobre el sistema Agr de <i>S. aureus</i> .....	115
5.3.1.5	Influencia de <i>S. aureus</i> sobre el sistema QS- <i>pqs</i> de <i>P. aeruginosa</i> .....	117
5.3.2	Caracterización de las cepas clínicas de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> aisladas consecutivamente de pacientes con ITRI.....	119
5.3.2.1	Interacciones entre <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> en la formación de <i>biofilm</i> estático y en flujo continuo. ....	119
	DISCUSIÓN GENERAL.....	125
	CONCLUSIONES .....	131
	ANEXOS .....	133
	Anexo 1. Hoja de recogida de datos clínico-epidemiológicos.....	133
	Anexo 2. Medios de cultivo microbiológico .....	134
	Anexo 3. Optimización de las condiciones de cultivo .....	136
	Anexo 4. 26 <sup>th</sup> <i>European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i> .....	137
	Anexo 5. 49 <sup>o</sup> Congreso Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica .....	138
	Anexo 6. 27 <sup>th</sup> <i>European Respiratory Society International Congress</i> .....	139
	Anexo 7. 28 <sup>th</sup> <i>European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i> .....	140
	BIBLIOGRAFÍA .....	141

## ARTÍCULOS GENERADOS EN ESTA TESIS

---

### **Artículo 1**

**Persistent isolation of *Staphylococcus aureus* in mechanically-ventilated patients: Impact of host-pathogen factors on outcome.**

Lacoma A, Gomes-Fernandes M, Mesalles E, Arméstar F, Prat C. Archivos de Bronconeumología 2018. *In Press*

### **Artículo 2**

**Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections.**

Gomes-Fernandes M, Laabei M, Pagan N, Hidalgo J, Molinos S, Villar Hernandez R, Domínguez-Villanueva D, Jenkins ATA, Lacoma A, Prat C. PLoS One. 2017 Apr 14;12(4):e0175552

## RESUMEN

---

*Staphylococcus aureus* es uno de los principales patógenos comensales y oportunistas responsables de causar infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI). Es conocida la dificultad de distinguir entre colonización e ITRI por *S. aureus* tanto en pacientes crónicos como en pacientes sin neumopatía de base. La prevalencia de colonización por este microorganismo dificulta establecer el valor clínico del aislado en muestra respiratoria en determinados grupos de pacientes y establecer la verdadera indicación del tratamiento. En pacientes sometidos a ventilación mecánica (VM), la potencial gravedad del desarrollo de neumonía da lugar a frecuente prescripción antibiótica de forma empírica, favoreciendo a su vez el desarrollo de resistencias. El estudio de factores tanto del microorganismo como del hospedador, debería facilitar la distinción entre los estadios de colonización e infección. Por tanto, el objetivo de este trabajo es determinar la importancia clínica del aislamiento de *S. aureus* en las vías respiratorias inferiores de pacientes sometidos a VM, mediante el estudio de factores asociados con la persistencia y la adaptación del microorganismo a este nicho anatómico. Esto representaría un cambio importante en el diagnóstico y el manejo de las ITRI causadas por este microorganismo.

Inicialmente se estudió qué factores del hospedador y del microorganismo estarían relacionados con la evolución clínica y el aislamiento persistente de *S. aureus* en muestra respiratoria. Esto se llevó a cabo en una cohorte de pacientes ingresados en UCI y sometidos a VM, que fueron clasificados en diferentes grupos en cuanto a la relación del aislado con el hospedador (infección vs. colonización). Se demostró que, de entre las diferentes variables evaluadas, el resultado clínico desfavorable es independiente de los días bajo VM y de estancia en la UCI, así como del perfil genético y el patrón de resistencia a la cloxacilina de los aislados. Además, hemos demostrado que el aislamiento persistente de *S. aureus*, observado en aproximadamente el 40% de los pacientes, tampoco se asoció con la evolución clínica desfavorable. La resistencia a la cloxacilina se correlacionó con la persistencia en el aislamiento, aunque también se observaron casos persistentes de aislados sensibles a meticilina. Por otro lado, la persistencia de *S. aureus* en muestra respiratoria resultó ser frecuente en los pacientes que presentaban un aislamiento consecutivo de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta asociación nos llevó a investigar las interacciones entre *S. aureus* y *P. aeruginosa*, otro importante agente etiológico de ITRI frecuentemente aislado en la misma localización anatómica. El estudio de las interacciones entre estos microorganismos nos permitió ampliar el conocimiento respecto a las relaciones interespecies y su impacto sobre la virulencia, persistencia y adaptación al tracto respiratorio, y la progresión o cronicidad de la infección.

A continuación, se analizó la funcionalidad del sistema *quorum sensing* (QS)- *agr* (*accessory gene regulator*), uno de los principales sistemas de regulación de la virulencia

en *S. aureus*, en aislados provenientes de pacientes con ITRI. Alrededor del 83% de los aislados resultaron tener el sistema Agr funcional. Se observaron correlaciones entre la funcionalidad del Agr y la capacidad de formación de *biofilm* de los aislados. No obstante, la actividad de este sistema regulador de virulencia parece no tener influencia en el resultado clínico desfavorable de los pacientes, ni tampoco en el aislamiento persistente. Los hallazgos obtenidos en este estudio destacan que tanto la funcionalidad del sistema Agr, como el aislamiento persistente, observados a menudo en los aislados provenientes de pacientes sometidos a VM, corresponden más a fenotipos de adaptación del microorganismo al microbioma del tracto respiratorio, que a fenotipos de virulencia relacionados con el resultado clínico desfavorable. Por lo tanto, esto refuerza la observación de que las infecciones del tracto respiratorio a menudo se manejan de forma subóptima con respecto al diagnóstico correcto, indicación, dosis y duración del tratamiento antimicrobiano.

En cuanto a las relaciones interespecíficas entre aislados de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en pacientes con ITRI aguda, se observó que de forma similar a lo que ocurre en aislados provenientes de pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, *P. aeruginosa* compete y supera a *S. aureus* en condiciones de cultivo estándar de laboratorio. Sin embargo, la presencia de un medio de cultivo que simula *in vitro* la mucosidad del tracto respiratorio, favorece la coexistencia entre ellos, e influye en la actividad de los sistemas QS y en el desarrollo de fenotipos relacionados con la virulencia como es la formación de *biofilm*.

Finalmente, este trabajo sugiere el uso de un enfoque que combine métodos fenotípicos y genotípicos, donde además se consideren las relaciones interespecies entre los diferentes componentes del microbioma respiratorio, a la hora de investigar con mayor precisión las posibles asociaciones entre los factores microbianos y la evolución clínica y la susceptibilidad a los antibióticos en las ITRI por *S. aureus*.

## SUMMARY

---

*Staphylococcus aureus* is one of the most important commensal and opportunistic pathogen responsible for causing lower respiratory tract infections (LRTI). The difficulty in distinguishing between colonization and LRTI by *S. aureus* is well known in both chronic patients and patients without underlying lung diseases. The prevalence of colonization by this microorganism makes it difficult to determine the clinical value of an isolation in a respiratory sample in certain groups of patients and to establish an appropriate treatment. In patients undergoing mechanical ventilation (MV), the potential severity of developing pneumonia gives rise to frequent empirical antimicrobial prescription, favoring at the same time the development of resistance. The study of factors from both the microorganism and the host should facilitate the distinction between the stages of colonization and infection. Therefore, the objective of the present work is to determine the clinical importance of the isolation of *S. aureus* in the lower respiratory tract of patients undergoing MV, by studying factors associated with the persistence and adaptation of the microorganism to this anatomical niche. This would represent a significant change in the diagnosis and management of LRTIs caused by this microorganism.

Initially, we focused on studying which factors of the host and the microorganism could be related to the clinical course and the persistent isolation of *S. aureus* in respiratory samples. This was carried out in a cohort of patients admitted to the ICU and undergoing MV, who were classified into different groups regarding the relationship of the isolate with the host (infection vs. colonization). We have shown that among the different variables evaluated, an unfavorable clinical outcome was independent of the days under MV and stay in the ICU, as well as the genetic profile and the resistance pattern to cloxacillin of the isolates. In addition, we have shown that persistent isolation of *S. aureus*, observed in approximately 40% of the cases, was also not associated with the clinical outcome. Resistance to cloxacillin was significantly associated with persistence, although cases of persistent methicillin susceptible isolates were also reported. On the other hand, the persistence of *S. aureus* in the respiratory sample was found to be frequent in patients with consecutive isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. This association led us to investigate the interactions between *S. aureus* and *P. aeruginosa*, another important etiological agent of LRTIs frequently isolated in the same anatomical location. The study of the interactions between these two microorganisms would expand the knowledge on interspecies relationships and their impact on virulence, persistence, and adaptation to the respiratory tract, as well as the progression or chronicity of the infection.

Next, we analyzed the functionality of the quorum sensing system (QS) - *agr* (accessory gene regulator), one of the main virulence regulation systems in *S. aureus*, in isolates from patients with LRTI. Approximately 83% of the isolates were found to have a functional Agr system. Correlations were observed between the functionality of the Agr

and the *biofilm* formation capacity of the clinical isolates. However, the activity of this virulence regulatory system does not seem to influence on the unfavorable clinical outcome of the patients, nor on the persistent isolation. The findings obtained in this study highlight that both the functionality of the Agr system and persistent isolation, often observed in isolates from patients undergoing MV, correspond more to adaptation phenotypes of the microorganism to the respiratory tract microbiome than to virulence phenotypes related to the unfavorable clinical outcome. Therefore, this reinforces the observation that respiratory tract infections are often handled suboptimally with respect to the correct diagnosis, indication, dosing and duration of antibiotic regimens.

Regarding the interspecific relationships between *S. aureus* and *P. aeruginosa* isolated from patients with acute LRTI, we have observed that similarly to what occurs in isolates from patients with chronic respiratory diseases, *P. aeruginosa* inhibits and outcompetes *S. aureus* under standard laboratory culture conditions. However, the presence of a mucus-like medium favors the coexistence between them and influences the activity of the QS systems and the development of phenotypes related to virulence such as *biofilm* formation in both microorganisms.

Finally, this work proposes the use of a combined approach that includes both phenotypic and genotypic methods, and that also considers the interspecies relations among the different components of the respiratory microbiome, to investigate accurately the possible associations between the microbial factors and the clinical outcome, and antimicrobial susceptibility in LTRIs caused by *S. aureus*.

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

<b>3-oxo-C12 –AHL</b>	N-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona
<b>agr</b>	<i>Accessory gene regulator</i>
<b>AHL</b>	N-acil-homoserina-lactona
<b>AIP</b>	<i>Auto inducing peptide</i>
<b>AI</b>	Moléculas auto inductora
<b>APACHE II</b>	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation-II</i>
<b>ASM</b>	<i>Artificial sputum medium</i>
<b>AT</b>	Aspirado traqueal
<b>C4-AHL</b>	N-butanoil homoserina lactona
<b>CC</b>	Complejo clonal
<b>CHIPS</b>	<i>Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>cna</b>	<i>Collagen binding adhesin</i>
<b>CPIS</b>	<i>Clinical Pulmonary Infection Score</i>
<b>CV</b>	Cristal violeta
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>EPS</b>	Exopolisacáridos
<b>fnbA</b>	<i>Fibronecting-binding protein A</i>
<b>fnbB</b>	<i>Fibronecting-binding protein B</i>
<b>FQ</b>	Fibrosis quística
<b>GCS</b>	Escala de coma de Glasgow
<b>GISA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia a los glicopéptidos

<b>GlcNAc</b>	N-acetil glucosamina
<b>hla</b>	Alfa $\alpha$ -hemolisina
<b>hlb</b>	Beta $\beta$ -hemolisina
<b>hld</b>	Delta $\delta$ - hemolisina
<b>HQNO</b>	2-heptil-4-hidroxi-quinolona N-oxido
<b>hVISA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia heterogénea a vancomicina
<b>IEC</b>	<i>Immune evasion cluster</i>
<b>IQS</b>	[2- (2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído]
<b>ITRI</b>	Infecciones del tracto respiratorio inferior
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>lukS/F-PV</b>	Gen de la leucocidina de <i>Panton Valentine</i>
<b>mecA</b>	<i>penicillin binding protein 2A</i>
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
<b>MSCRAMM</b>	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule</i>
<b>MSSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a la meticilina
<b>NAH</b>	Neumonía adquirida en el hospital
<b>NAV</b>	Neumonía asociada a la ventilación
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PIA</b>	<i>Polysaccharide intercellular adhesin</i>
<b>PQS</b>	<i>Pseudomonas quinolone signal</i>
<b>PSM</b>	<i>Phenol soluble modulins</i>
<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa con transcripción reversa
<b>QS</b>	<i>Quorum sensing</i>

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>Sak</b>	Estafiloquinasa
<b>sar A</b>	<i>Staphylococcal accessory regulator A</i>
<b>SCCmec</b>	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
<b>SCN</b>	<i>Staphylococcal complement inhibitor</i>
<b>SCV</b>	<i>Small Colony Variant</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TCRS</b>	<i>Two-component regulatory system</i>
<b>TE</b>	Tubo endotraqueal
<b>TSB</b>	<i>Tryptic Soy Broth</i>
<b>TSST-1</b>	Toxina del síndrome del <i>shock</i> tóxico
<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>VISA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia a vancomicina
<b>VLT</b>	Test de lisis de vesículas
<b>VM</b>	Ventilación mecánica

## LISTA DE TABLAS

Nº	Descripción	Página
1	Principales factores de virulencia conocidos de <i>S. aureus</i>	30
2	Principales factores de virulencia conocidos de <i>P. aeruginosa</i>	33
3	Ejemplos de genes o clúster de genes de virulencia regulados por el sistema Agr.	45
4	Cepas bacterianas de referencia utilizadas en este estudio	57
5	Análisis univariante de las características clínicas y epidemiológicas en función de los grupos de estudio considerados	75
6	Análisis univariante de las características genotípicas de los aislados clínicos en función de los grupos de estudio considerados	86
7	Distribución de la resistencia a la meticilina y alelos agr de acuerdo a los grupos de estudio considerados	87
8	Concordancia entre la prueba de CAMP y el VLT	88
9	Descripción de los casos discordantes entre el VLT y la prueba de CAMP	90
10	Funcionalidad del sistema Agr mediante el consenso entre las tres pruebas realizadas.	92
11	Correlación entre la funcionalidad del sistema Agr y las variables clínicas: aislamiento persistente (> 72h) y el resultado clínico para los pacientes con ITRI y bacteriemia.	95
12	Correlación entre la funcionalidad del sistema Agr y las características genotípicas de los aislados clínicos de <i>S. aureus</i>	99
13	Correlación entre la funcionalidad del sistema Agr, y la formación de <i>biofilm</i>	104
14	Co-aislados de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> y características de los pacientes	105
15	Características fenotípicas y genotípicas de las cepas clínicas de <i>S. aureus</i> co-aisladas	106
16	Características fenotípicas y genotípicas de las cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> co-aisladas	107

## LISTA DE FIGURAS

Nº	Descripción	Pág.
1	Estructura y factores de virulencia estudiados de <i>S. aureus</i>	30
2	Etapas de la formación de <i>biofilm</i>	36
3	Representación de las interacciones conocidas sobre la regulación de la virulencia en <i>S. aureus</i>	38
4	Estructura y activación del sistema Agr en <i>S. aureus</i>	41
5	Estructura de los AIPs (I-IV) de <i>S. aureus</i>	43
6	Esquema representativo de las cuatro redes de señalización QS en <i>P. aeruginosa</i> y sus respectivos autoinductores	49
7	Diagrama de flujo de la cohorte de pacientes, muestras respiratorias y aislados clínicos de <i>S. aureus</i> analizados en el objetivo 1.	58
8	Diagrama de flujo de la cohorte de pacientes y aislados clínicos de <i>S. aureus</i> analizados en el objetivo 2.	59
9	Membrana del <i>microarray S. aureus genotyping</i> .	61
10	Resultados de la prueba de CAMP y de la actividad hemolítica en agar sangre	62
11	Principio del test de vesículas (VLT)	63
12	Metodología utilizada para el ensayo de formación de <i>biofilm</i> cruzado	67
13	Sistema de flujo continuo y visualización del <i>biofilm</i> a través de microscopia confocal	69
14	Aislamiento persistente de MRSA y MSSA en muestra de origen respiratorio	82
15	Niveles de expresión relativa del gen <i>rnalIII</i> obtenidos mediante qRT-PCR para las 21 cepas con resultado discordante entre la prueba de CAMP y VLT	91

Nº	Descripción	Pág.
16	Formación relativa de <i>biofilm</i> en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% para las 46 cepas de <i>S. aureus</i> seleccionadas en base a la funcionalidad del sistema Agr	102
17	Formación relativa de <i>biofilm</i> en la mezcla (1:1) de los medios ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% para las 46 cepas de <i>S. aureus</i> seleccionadas en base a la funcionalidad del sistema Agr	102
18	Cinética del crecimiento planctónico en medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% durante 10h, para los pares co-aislados clínicos de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	108
19	Crecimiento planctónico en cultivo mixto, realizado en la mezcla 1:1 del medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, para los pares clínicos co-aislados de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	109
20	Formación de <i>biofilm</i> relativa por <i>S. aureus</i> en presencia o ausencia del sobrenadante de <i>P. aeruginosa</i> (diluido 1:10) de su par co-aislado	110
21	Formación de <i>biofilm</i> relativa por <i>P. aeruginosa</i> en presencia o ausencia del sobrenadante de <i>S. aureus</i> (diluido 1:10) de su par co-aislado	111
22	Imágenes representativas del <i>biofilm</i> simple y mixto (MIX) formado por las cepas clínicas co-aisladas de <i>S. aureus</i> (SAR) y <i>P. aeruginosa</i> (PAR) en medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, visualizadas a través de microscopía láser confocal	113
23	Imágenes representativas del <i>biofilm</i> simple y mixto (MIX) formado por las cepas clínicas co-aisladas de <i>S. aureus</i> (SAR) y <i>P. aeruginosa</i> (PAR) en una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, visualizadas por microscopía láser confocal	114
24	Niveles de expresión del gen <i>rnalIII</i> en las cepas de <i>S. aureus</i> (SAR) en presencia y ausencia del sobrenadante de la cepa co-aislada de <i>P. aeruginosa</i> correspondiente	115
25	Niveles relativos de expresión del gen <i>rnalIII</i> en las cepas de <i>S. aureus</i> (SAR) en cultivo simple y mixto con su cepa co-aislada de <i>P. aeruginosa</i> , en una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% durante 24h.	117
26	Niveles de expresión relativa del gen <i>pqsL</i> en cepas de <i>P. aeruginosa</i> (PAR) en cultivo simple y mixto con la cepa co-aislada de <i>S. aureus</i> correspondiente en una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% durante 24h	118

Nº	Descripción	Pág.
27	Dinámica de crecimiento de los pares clínicos de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> aislados consecutivamente 1 y 2	120
28	Formación de <i>biofilm</i> "cruzado" por los pares clínicos de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> aislados consecutivamente 1 y 2	121
29	Imágenes representativas de la arquitectura del <i>biofilm</i> simple formado por cultivo puro de los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (PAR 1 y PAR 2) después de 48h de incubación en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% en flujo continuo, a través de microscopía láser confocal	122
30	Imágenes representativas de la arquitectura del <i>biofilm</i> simple formado por cultivos puros de los aislados clínicos de <i>S. aureus</i> (SAR 1 y SAR 2) después de 48h de incubación en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% en flujo continuo, a través de microscopía láser confocal	122
31	Imágenes representativas de la arquitectura del <i>biofilm</i> mixto formado por los pares clínicos de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> aislados consecutivamente 1 y 2, después de 48h de incubación en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% en flujo continuo, a través de microscopía láser confocal	123

---

## INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 Estructura del tracto respiratorio

---

El sistema respiratorio está constituido por las vías aéreas superiores (boca, fosas nasales, faringe y laringe), vías aéreas inferiores (tráquea, bronquios y pulmones) y por otras estructuras que contribuyen a promover los procesos de inhalación y exhalación del aire, como la pared torácica y su musculatura, la pleura y el diafragma (1).

La pared torácica está formada en la parte posterior por la columna vertebral, en la parte anterior por el esternón, y a cada lado por las costillas. Ocupando el espacio entre las costillas se encuentran los músculos, los vasos y los nervios intercostales. La cavidad torácica, a su vez, presenta tres grandes regiones ocupadas por órganos que pertenecen a varios sistemas corporales; comunica libremente con el cuello, pero está separada del abdomen por el diafragma, el músculo más importante de la respiración. La pleura representa una túnica serosa, brillante y lisa. Posee dos membranas, una que se adhiere íntimamente al pulmón (pleura visceral) y otra que reviste la pared torácica, el mediastino y el diafragma (pleura parietal). Entre ambas se forma un espacio virtual denominado espacio pleural, que contiene una pequeña cantidad de líquido necesario para lubricarlas y así evitar la fricción. El mediastino es el espacio situado en el centro del tórax, entre ambos recesos pleurales, y que aloja órganos importantes como el corazón, a la vez que sirve de paso a estructuras como el esófago, tráquea, y los grandes vasos (1).

La tráquea, así como los bronquios, está tapizada por una mucosa ciliada secretora de moco, típica del tracto respiratorio. De la bifurcación traqueal salen dos grandes bronquios principales (derecho e izquierdo), que a su vez se ramifican en tres y dos ramas de bronquios lobares, respectivamente, formando el árbol bronquial de los pulmones. En el interior de los pulmones, y de manera progresiva, cada una de estas ramas bronquiales se divide en bronquios de menor calibre hasta finalizar en los alveolos pulmonares (1).

Los pulmones están situados en la caja torácica a ambos lados del corazón en cuya base se encuentra el diafragma. Los pulmones se componen de lóbulos; el derecho contiene tres (superior, medio e inferior) y el izquierdo dos (superior e inferior). Cada lóbulo presenta una serie de secciones denominadas segmentos pulmonares, provistos de ramas bronquiales, arterias y venas. Se distinguen dos partes en el pulmón: una central, conocida como el hilio, en la cual confluyen el bronquio principal, la arteria y venas pulmonares, y los vasos linfáticos; y una otra periférica, donde ocurre la hematosi debido a la presencia de los alveolos con su red de vasos capilares (1).

## 1.2 La microbiota y el microbioma del tracto respiratorio

Como una de las puertas de entrada al organismo, el tracto respiratorio alberga por sí mismo una gran cantidad de microorganismos, conocido como microbiota respiratoria, de composición heterogénea y que disminuye en biomasa del tracto superior al inferior (2). A su vez, el término microbioma se refiere al conjunto de microorganismos que componen la microbiota y su material genético. En base a que sólo un 1% de este conjunto de microorganismos crece en cultivo (3), el desarrollo de técnicas independientes de cultivo, como las técnicas moleculares, ha ampliado el conocimiento y la localización de las comunidades bacterianas pertenecientes al microbioma de las vías aéreas (4, 5). La composición del microbioma respiratorio residente en los estados sanos y alterados es actualmente un importante objeto de estudio y parece depender del equilibrio entre tres factores: 1) Migración microbiana en las vías respiratorias; 2) Eliminación de los microorganismos de las vías respiratorias; y 3) Tasas de reproducción relativa de los miembros de la comunidad (6), aunque también es importante considerar otro aspecto como la exposición a agentes externos.

Formando parte de la microbiota del tracto respiratorio superior podemos encontrar, entre otros, microorganismos como *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium*, estreptococos no hemolítico y alfa-hemolítico, *Neisseria*, además de otros potencialmente reconocidos como agentes patógenos, tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* (7).

Estudios recientes han demostrado que la composición del microbioma de la orofaringe y del árbol broncopulmonar en el individuo sano son bastante parecidos. Esta similitud se podría explicar por la aspiración de secreciones que ocurre durante el sueño (5, 8). Por otro lado, el pulmón de un individuo sano, considerado anteriormente como una zona estéril, también puede albergar un microbioma funcional y estable que está formado por una amplia gama de géneros (9).

Existen evidencias de que la composición del microbioma de las vías aéreas varía entre individuos sanos y personas con enfermedades respiratorias crónicas, como el asma, la fibrosis quística (FQ) y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Formando parte de la microbiota de las vías respiratorias inferiores en estos grupos de pacientes se puede observar la presencia de bacterias patógenas oportunistas, que colonizan y contribuyen a la progresión de la actividad inflamatoria pulmonar, como *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *S. pneumoniae* (7). Algunos estudios asocian las exacerbaciones y los procesos inflamatorios, característicos de estas enfermedades, a los cambios en la densidad microbiana y a la adquisición de nuevas variantes genéticas y/o especies en la microbiota residente (10).

Respecto a los pacientes con neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV), parece ser que la presencia de cuerpos extraños, como el tubo endotraqueal (TE) o la cánula de

traqueostomía, puede alterar el microbioma colonizador. Hay indicios de que la patogenia de esta infección, que está asociada con la composición del microbioma colonizador, se correlaciona con el pronóstico del paciente, y que la presencia de *P. aeruginosa* es el predictor más importante en la supervivencia del paciente, seguido de la edad y de la abundancia relativa de miembros de la familia *Staphylococcaceae* (11).

El conocimiento sobre la composición del microbioma respiratorio residente durante las enfermedades respiratorias, y la implicación real de los microorganismos considerados como comensales en la patogenia es reciente, y todavía se encuentra poco explorado. La implementación de técnicas basadas en el análisis del RNA bacteriano podría proporcionar información relevante para estudios futuros dirigidos a conservar la microbiota endógena, que actúa como mutualista y facilita la funcionalidad del sistema respiratorio frente a los patógenos que la sustituyen progresivamente, especialmente en pacientes con EPOC y FQ (3).

### **1.3 Interacción hospedador y microbiota residente: concepto colonización-infección**

La microbiota de las vías respiratorias, tal y cómo se ha comentado previamente, está formada por una cantidad importante y variada de microorganismos comensales y potencialmente patógenos que han co-evolucionado con el hospedador. La diversidad de especies que componen esta microbiota, y que está en cambio permanente a lo largo de la vida del individuo, se ve influenciada por diferentes factores tales como, la edad del hospedador, su estado inmunológico, sus hábitos de vida (por ejemplo si es fumador) y la exposición previa a antibióticos, entre otros (12). Cada microorganismo tiene un nicho ambiental particular dentro del hospedador (13), y algunas alteraciones como los cambios fisiológicos (aumento de la producción de moco y la disminución del aclaramiento mucociliar) o los cambios genéticos (incorporación de elementos genéticos móviles y/o regulación génica mediante la densidad bacteriana), pueden perturbar esta relación comensal de adaptación, y favorecer la proliferación y consecuente infección por estos microorganismos (12, 14).

El aislamiento en muestras de origen respiratorio de especies pertenecientes a la microbiota respiratoria endógena, o incluso de microorganismos de reciente adquisición no siempre se asocia con el desarrollo de una infección respiratoria (14). Se observa de forma frecuente la presencia de *S. pneumoniae* (15) y *H. influenzae* en la microbiota nasofaríngea de los niños en edad preescolar y en pacientes con enfermedad pulmonar subyacente (14), de la misma manera que alrededor del 30% de la población es portadora asintomática de *S. aureus* en la nasofaringe (16). Además, *S. aureus* puede aislarse en muestras respiratorias de pacientes con enfermedad respiratoria crónica (17) sin que su presencia necesariamente esté asociada al desarrollo de una enfermedad infecciosa. La colonización por *P. aeruginosa* a su vez, requiere inicialmente de una patología subyacente, pero también ha sido observada en casos sin infección activa (7). La adquisición de este patógeno se produce a partir de microorganismos presentes en el

ambiente, y el desarrollo de la colonización-infección crónica ocurre a través de un intenso proceso de adaptación genética y fisiológica (17).

Un estudio reciente (18) demuestra que el concepto de colonización-infección broncopulmonar es crítico para comprender el proceso patogénico de las enfermedades respiratorias crónicas. Esta entidad se produce en el contexto de neumopatías de base, y se caracteriza por la disminución de la capacidad de eliminación de los microorganismos de las vías respiratorias inferiores y su presencia persistente, que conduce a procesos inflamatorios locales, variantes bacterianas con alta resistencia a los antimicrobianos y frecuentes exacerbaciones. Por ejemplo, el aislamiento de *S. aureus* en muestra respiratoria suele ser frecuente en pacientes que padecen de FQ, bronquiectasias, EPOC y neoplasias con neumonitis obstructiva. Según este concepto, pese a la elevada carga bacteriana de *S. aureus* en las vías aéreas de estos pacientes, rara vez desarrollan infección del parénquima pulmonar (18). De esta forma, *S. aureus* puede persistir en las vías respiratorias de estos pacientes sin provocar alteraciones aparentes. Sin embargo, su presencia causa una lesión inicial, con escasa repercusión funcional, que podría predisponer a la colonización posterior por *P. aeruginosa* (17).

La colonización crónica en este grupo de pacientes acaba por producir respuestas inflamatorias de tal naturaleza que la función pulmonar se ve afectada hasta límites críticos (18). Además, la adaptación de estos microorganismos al tracto respiratorio les permite persistir en este ambiente durante largos periodos, incluso bajo la acción de terapia antimicrobiana ajustada a la susceptibilidad *in vitro*, dificultando así establecer el verdadero valor clínico del aislamiento (14).

Debido a su relevancia como patógenos oportunistas del tracto respiratorio, su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos (19) y su frecuencia como agentes causantes de infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI) de origen nosocomial (20), *S. aureus* es el principal objeto de estudio en este trabajo, donde además se aborda su interacción con *P. aeruginosa* en el contexto de la co-colonización y coinfección del tracto respiratorio inferior.

#### **1.4 Infecciones del tracto respiratorio inferior**

---

El establecimiento de la colonización por determinados microorganismos en las vías respiratorias, es un factor de riesgo para el desarrollo de infección. Los pasos previos a las infecciones del tracto respiratorio son el cambio cualitativo de la microbiota normal de la orofaringe (especies más invasivas o resistentes), cuantitativo (incremento de la carga bacteriana colonizadora) o una combinación de ambos factores. Este proceso que puede ocurrir hasta en un 60% de los pacientes se produce generalmente durante la hospitalización prolongada y en situaciones de presión antibiótica, también a nivel ambulatorio (21).

En los últimos años se ha observado un aumento en las infecciones estafilocócicas del tracto respiratorio superior que podría estar relacionado con el desplazamiento de la microbiota comensal debido a la introducción de la vacuna neumocócica (22). Estas infecciones en general presentan un curso benigno, pero en algunos casos pueden provocar complicaciones como otitis, mastoiditis, sinusitis, o patologías más graves como los abscesos retrofaríngeos o epiglotitis. Por otro lado, como integrante de la microbiota endógena en un elevado porcentaje de la población, *S. aureus* accede a las vías aéreas inferiores, mayormente, debido a aspiraciones repetidas de las secreciones orofaríngeas, o por diseminación hematógena desde otro foco de infección (23).

A nivel nosocomial, las ITRI representan un número significativo de casos en los cuadros infecciosos que están asociados a tasas elevadas de morbilidad y mortalidad, además de ser una de las causas más frecuentes de prescripción de tratamiento antibiótico (14, 21). La neumonía adquirida en el hospital (NAH) y la NAV, juntas representan el 22% de todas las infecciones de origen nosocomial (24). La NAV es la primera causa de infección en el paciente ventilado. Estudios recientes demuestran que aproximadamente el 10% de los pacientes sometidos a VM son diagnosticados con NAV (25).

Tanto la NAH como la NAV se producen generalmente por microaspiración de las secreciones orofaríngeas o gástricas contaminadas con microbiota colonizante (generalmente modificada por sobrecrecimiento o tratamiento antibiótico previo prolongado), por aspiración de un gran inóculo de microorganismos y por alteración o abolición de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio de tipo mecánico (epitelio ciliado y moco), humoral (anticuerpos) y celular (polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos y sus respectivas citocinas) (26).

El paciente ventilado mecánicamente es más propenso a la colonización pulmonar por organismos pertenecientes a la microbiota orofaríngea. La presencia del TE obstaculiza el reflejo normal de la tos, así como el aclaramiento mucociliar normal de las secreciones orofaríngeas, y por lo tanto facilita una vía de entrada de los microorganismos a los pulmones. Además, la presencia del TE actúa como reservorio bacteriano debido a la acumulación de una biopelícula (en inglés *biofilm*) que lo recubre, y que más tarde se desprende y se disemina hacia al pulmón durante la VM o la manipulación del propio tubo (21, 27). No obstante, parece ser que la propia VM induce una inmunosupresión local, que tiene como resultado una reducción en el proceso de fagocitosis bacteriana (28). Esta alteración inmunitaria aumentaría el riesgo de desarrollo de infecciones en el paciente ventilado.

Debido al aumento en la frecuencia de organismos resistentes a múltiples fármacos como causa de infecciones respiratorias, así como el riesgo elevado de gravedad, en la mayoría de los casos se implementa una terapia empírica con antimicrobianos de amplio espectro, y por decisión de consenso, se realizan cultivos de las secreciones respiratorias de prácticamente todos los pacientes con sospecha de NAV (24).

Según un estudio reciente que documenta la neumonía de origen nosocomial en 27 UCIs de nueve países de Europa, el 69,5% de los casos con sospecha de ITRI están asociados con aislamientos de microorganismos patógenos (20). Menos de diez microorganismos están implicados en la mayoría de los casos de ITRI asociados a VM, y una proporción sustancial de estas infecciones (32%) son de origen polimicrobiano. Entre los agentes etiológicos más frecuentemente aislados se encuentra: Enterobacterias, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (29).

La presión selectiva ejercida a causa de los tratamientos antibióticos en las ITRI favorece la selección de aislados resistentes de estos microorganismos, como *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *P. aeruginosa* multiresistente, a la vez que promueve la sustitución de la microbiota original por patógenos oportunistas (14).

En la NAV, *S. aureus* tiene un papel destacado por su implicación y frecuencia, principalmente en pacientes con afectación neurológica o sometidos a cirugía (30, 31), en la gravedad del cuadro clínico en pacientes con infección por el virus de la gripe (32), ya que el daño del epitelio pulmonar inducido por el virus facilita la posterior adhesión e invasión tisular estafilocócica (33, 34), y en el aumento de la resistencia a los antibióticos, entre ellos, la meticilina (35). Además, cabe destacar que la admisión en UCI de pacientes portadores de cepas multiresistentes representa un factor de riesgo que aumenta significativamente la frecuencia de infecciones nosocomiales causadas por organismos resistentes a múltiples fármacos (36). La neumonía por diseminación hematogena a su vez, sucede como complicación de endocarditis de cavidades derechas y es secundaria a la embolización de lesiones valvulares, con el resultado de infartos pulmonares (23).

Otro tipo de ITRI causada por este microorganismo, y que está relacionada epidemiológicamente con cepas MRSA de origen comunitario, portadoras del elemento genético móvil SCCmec tipo IV y productoras de la leucocidina de *Panton Valentine* (PVL), es la neumonía necrotizante (37). Los patrones característicos incluyen una neumonía de extensión rápida que frecuentemente viene precedida de una infección por virus influenza en pacientes jóvenes, con un pronóstico muy desfavorable y una elevada mortalidad (38).

Recientemente se ha observado un aumento en la prevalencia de estas cepas a nivel nosocomial, lo que refleja su diseminación desde la comunidad hacia el ambiente hospitalario. No obstante, estudios recientes cuestionan la función de la PVL en la neumonía (39), y su correlación con la severidad de la enfermedad y el resultado clínico del paciente con NAV (40). En cuanto a la neumonía causada por MRSA de origen comunitario, un estudio multicéntrico-internacional (41), con participación del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, ha reportado una baja prevalencia, y se ha asociado con determinados factores de riesgo como la infección o colonización previa por MRSA, infecciones cutáneas recurrentes y neumonía grave. Como complicaciones de la

infección pulmonar causada por *S. aureus* se observa entre otros el desarrollo de empiemas pleurales, abscesos pulmonares y bacteriemia (23).

Por otro lado, las ITRI causadas por *P. aeruginosa* pueden variar en gravedad desde una colonización asintomática o una traqueobronquitis benigna hasta una bronconeumonía necrotizante grave (42). Los pacientes con enfermedad crónica pulmonar, como los afectados de EPOC, FQ, bronquiectasias, y en menor frecuencia, pacientes neutropénicos, suelen ser colonizados y/o infectados frecuentemente por este microorganismo (42). La neumonía causada por *P. aeruginosa* se encuentra entre las neumonías más frecuentes y generalmente también más graves dentro del conjunto de neumonías nosocomiales, especialmente entre las que se desarrollan en los pacientes críticos y ventilados mecánicamente (43).

Los enfermos críticos tienen afectada su producción de inmunoglobulina A y fibronectina debido a un aumento de los niveles de proteasa. Eso a su vez, impide la adherencia de las bacterias Gram positivas a la mucosa orofaríngea y favorece la adherencia de las bacterias Gram negativas. De este modo, *P. aeruginosa*, que coloniza en tasas bajas la piel y las mucosas nasal y faríngea de las personas sanas, en los pacientes hospitalizados adquiere una tasa de colonización superior al 50%, especialmente tras la administración de tratamiento antimicrobiano prolongado, que además favorece la selección de cepas resistentes a múltiples fármacos (26). Los pacientes con inmunodepresión, alteración de los mecanismos respiratorios y hospitalización previa son especialmente susceptibles a la NAV por *P. aeruginosa* (21, 43).

El diagnóstico de la NAV presenta algunas limitaciones y controversias. Como se ha mencionado anteriormente, a parte de la colonización traqueal que ocurre con frecuencia en pacientes con una intubación endotraqueal (14, 21), los signos característicos de neumonía, como fiebre, recuento de leucocitos elevados y presencia de infiltrados radiológicos, pueden presentarse también en procesos no infecciosos en los enfermos críticos sometidos a VM. Otras causas como el distrés respiratorio, o las atelectasias pueden generar estos mismos signos en este grupo de pacientes.

Actualmente, se utilizan dos enfoques complementarios para determinar si un paciente ventilado mecánicamente presenta NAV: el enfoque clínico-radiológico y el enfoque microbiológico.

El abordaje clínico-radiológico generalmente se realiza a partir de diferentes escalas que utilizan puntuaciones para valorar la clínica de la infección pulmonar, como por ejemplo el índice CPIS (del inglés *Clinical Pulmonary Infection Score*). Los criterios clínicos utilizados en esta escala son fiebre, leucocitosis, oxigenación, radiografía de tórax y cultivo bacteriológico de los aspirados traqueales. Una vez evaluados, estos criterios clínicos se ponderan y se obtiene una puntuación final. Una puntuación de 6 o mayor

indica que el paciente tiene NAV (44). Pese a la controversia en cuanto a la utilidad del CPIS para diagnosticar NAV (20), su uso permite una estandarización del método, lo que facilita la comparación entre diferentes estudios.

El enfoque microbiológico se basa en realizar cultivos bacterianos (cuantitativo o semicuantitativo) que traten de discriminar entre colonización y verdadera infección mediante la determinación de la carga bacteriana, y posteriormente la realización de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana pertinentes. El árbol respiratorio puede ser muestreado en varios puntos a través de técnicas invasivas (fibrobroncoscopia) o no invasivas (aspirado traqueal) (21). Los procedimientos de cultivo cuantitativo actuales varían según el tipo de muestra pulmonar obtenida, pero en general, los recuentos de unidades formadoras de colonia (ufc) de un aislado, con valores superiores a  $10^5$ /mL sugieren una carga bacteriana de un patógeno potencial (45). De acuerdo a las nuevas directrices de diagnóstico y manejo de la NAV, se recomienda un muestreo no invasivo con cultivos semicuantitativos, dado que no se han observado diferencias significativas en los estudios publicados cuando se utilizan técnicas invasivas o cultivos cuantitativos (24).

Ambos enfoques propician una mejor aproximación para el diagnóstico y tratamiento antibiótico adecuado de la NAV, pues pese a los recientes avances en las técnicas diagnósticas, la distinción entre colonización e infección sigue siendo un reto a la hora de definir la importancia clínica del microorganismo aislado como el agente etiológico responsable por la infección o como microorganismo cuyo nicho ecológico en condiciones normales son las vías respiratorias (14).

### **1.5 *Staphylococcus aureus*: descripción del género y características generales**

El término *Staphylococcus*, que viene del griego *staphyle*=racimo y *kokkos*=granos, fue introducido inicialmente en 1880 por Alexander Ogston para describir a los micrococos implicados en la inflamación y supuración de las heridas (46). El Género *Staphylococcus* pertenece al Phylum 2 del Dominio *Bacteria*; Clase *Bacilli*; Orden *Bacillales*; y Familia *Staphylococcaceae* (47). Los organismos del género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una presentación característica en agrupaciones irregulares semejantes a racimos de uvas. Son bacterias aerobias o anaerobias facultativas, catalasa positiva, inmóviles, no formadoras de esporas y que pueden crecer en condiciones ambientales diversas. El género *Staphylococcus* incluye 35 especies y 17 subespecies, de las cuales algunas están presentes en la microbiota comensal de la piel y mucosas de los humanos y de algunos animales. Entre las especies que colonizan o que actúan como patógenos oportunistas en los humanos, destacan a parte de *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus lugdunensis*.

*S. aureus* se caracteriza por crecer en medios de cultivo convencionales. Después de 18-24h de incubación en medio sólido forma colonias de 1 a 3 mm de diámetro, de consistencia cremosa y con un color amarillo o dorado, característico de la producción de carotenoides. La mayoría de las colonias cuando crecen en agar sangre, presentan un halo hemolítico a su alrededor, correspondiente al patrón de  $\beta$ -hemólisis. Desde el punto de vista bioquímico, *S. aureus* se diferencia del resto de especies del género por producir coagulasa (una enzima que convierte el fibrinógeno en fibrina, formando los coágulos), fermentar el manitol, y por crecer bien a concentraciones elevadas de cloruro de sodio (NaCl).

Respecto a las características genéticas, el genoma de *S. aureus* está compuesto por un único cromosoma circular, de aproximadamente 2,8 Kb y con un contenido de G-C bajo (30-39%). Está constituido por secuencias de inserción, transposones, bacteriófagos e islas de patogenicidad, que contienen determinantes de virulencia y resistencia a múltiples antibióticos (48).

### **1.5.1 Epidemiología**

Considerado como uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, *S. aureus* es un microorganismo oportunista que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente (23). Empieza a formar parte de la microbiota humana en los neonatos poco después del nacimiento, y coloniza con frecuencia las fosas nasales, la garganta, la región perianal, el ombligo y la piel (49).

La colonización más frecuente por *S. aureus* es en la mucosa del vestíbulo nasal. Sin embargo, puede colonizar otras partes del cuerpo tales como el tracto gastrointestinal, el sistema genitourinario y las axilas. Aproximadamente un 20% de la población es portadora persistente de *S. aureus* en la nasofaringe y un 30% lo es de manera intermitente (50). Entre los factores que influyen en la incidencia de la colonización destaca la exposición continuada a entornos de alto riesgo, como el ámbito hospitalario, ganadero y veterinario (51). En el ámbito hospitalario, la colonización suele ser más frecuente en pacientes con antecedentes de diálisis (52), infecciones en la piel y otras enfermedades/comorbilidades de base como la obesidad, diabetes mellitus, eczema o psoriasis y dermatitis atópica (53, 54).

Fuera de estos ambientes, la colonización por *S. aureus* suele ser frecuente también entre sujetos infectados con VIH (55, 56), drogodependientes (57) y personas sin hogar (58). Estudios basados en población no hospitalizada correlacionan varios factores de riesgo con el estado de portador, incluyendo el uso de anticonceptivos orales, el tabaquismo, el hacinamiento (53) y también determinados factores sociodemográficos, tales como la edad, el género y la raza (54, 59).

En cuanto a patología infecciosa, *S. aureus* es la especie más virulenta e importante del género. La localización nasofaríngea del microorganismo favorece la diseminación y el desarrollo de infecciones subsecuentes en muchos casos (50). *S. aureus* se asocia con una amplia variedad de enfermedades que van desde infecciones de la piel y de tejidos blandos hasta neumonía, endocarditis o sepsis (60).

En la última década, las infecciones por *S. aureus* han reemergido debido a la resistencia del microorganismo a diversos antibióticos. *S. aureus* tiene una capacidad excepcional para adquirir resistencia a los antibióticos. Aunque el término resistencia a meticilina incluye resistencia a derivados  $\beta$ -lactámicos, las cepas MRSA presentan, en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos (61). Por otro lado, se ha observado también un cambio en el manejo y el tratamiento de las infecciones estafilocócicas debido a hechos importantes como la expansión de cepas MRSA en la comunidad, el origen de brotes de infecciones cutáneas y neumonías graves relacionadas con cepas productoras de PVL (23) y la aparición de cepas MRSA de origen nosocomial con sensibilidad disminuida a los glicopéptidos (62).

El porcentaje de aislados MRSA en Europa disminuyó significativamente entre 2012 y 2015 con valores del 18,8% y a 16,8%, respectivamente (63). Esta tendencia se ha observado también en España, donde en los últimos años viene ocurriendo un aparente descenso en los casos de aislados MRSA en los hospitales de gran tamaño. Sin embargo, se detecta un incremento significativo de los casos de origen comunitario (61).

### **1.5.2 Estructura y factores de virulencia**

La patogenicidad de *S. aureus* se considera un proceso complejo y multifactorial, resultado de la acción combinada de un arsenal de factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección (colonización, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación y diseminación).

Los factores de virulencia de *S. aureus* incluyen componentes estructurales que facilitan la adherencia a los tejidos del hospedador y evitan la fagocitosis, como también factores extracelulares secretados que actúan en la invasión de los tejidos (64) (Figura 1). En la tabla 1 se encuentran recopilados los principales determinantes de la patogenicidad en *S. aureus* y sus respectivas funciones.

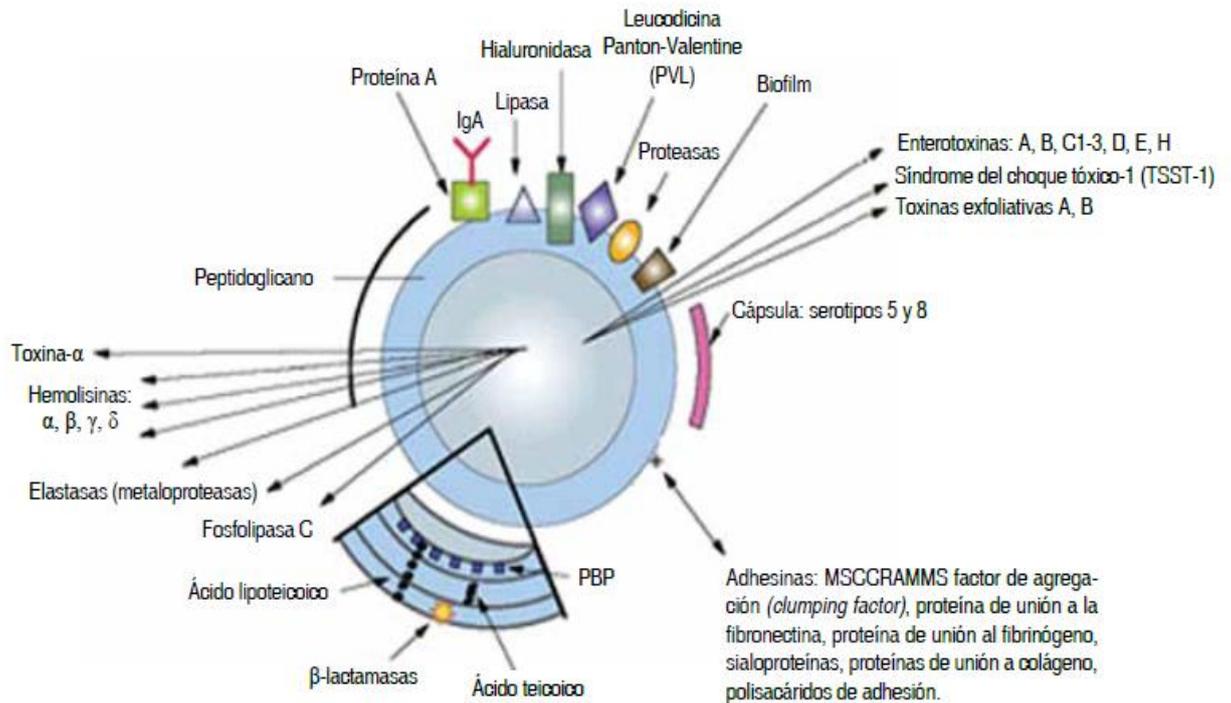


Figura 1. Estructura y factores de virulencia estudiados de *S. aureus*. Modificado a partir de (48).

Tabla 1. Principales factores de virulencia conocidos de *S. aureus*. Tomado de (23, 65-68).

Factores de virulencia	Función y efecto de su actividad para el patógeno y/o el hospedador
<b>Componentes estructurales</b>	
Cápsula externa o glucocalix	Adherencia y actividad antifagocitaria
Peptidoglicano	Actividad endotóxica y tolerancia osmótica
Ácidos teicoicos	Adherencia y actividad antifagocitaria
Adhesinas	Adherencia y evasión del sistema inmune
<b>Factores extracelulares</b>	
<b>Enzimas</b>	
Catalasa	Supervivencia en fagocitos
Coagulasa	Formación de abscesos y actividad antifagocitaria
Hialuronidasa	Invasión tisular
Lipasa, nucleasa, proteasa	Invasión y colonización
<b>Toxinas citolíticas</b>	
Hemolisinas <sup>a</sup>	Lisis celular
Leucocidinas <sup>b</sup>	Lisis celular
PSMs <sup>c</sup>	Lisis celular y actividad intracelular
<b>Superantígenos</b>	
Toxinas exfoliativas	Epidermólisis
Toxina TSST-1	Shock tóxico

Factores de virulencia	Función y efecto de su actividad para el patógeno y/o el hospedador
Enterotoxinas	Actividad emética
<b>Proteínas de acción antiinflamatoria</b>	
CHIPS	Bloquea la quimiotaxis de los neutrófilos
SCIN	Inhibición del complemento
FLIPr	Inhibición del complemento

a) Alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) hemolisinas; b) Gama hemolisina ( $\gamma$ ) y PVL; c) PSMs: *Phenol Soluble Modulins*, PSM $\alpha$ 1- PSM $\alpha$ 4, PSM $\beta$ 1 y PSM $\beta$  2 y delta ( $\delta$ ) hemolisina; TSST-1: Toxina del Síndrome del shock tóxico-1; CHIPS: *Chemotaxis inhibitory protein of S. aureus*; SCIN: *Staphylococcal complement inhibitor*; FLIPr: *S. aureus Formyl Peptide Receptor-like 1 Inhibitor*

### 1.6 *Pseudomonas aeruginosa*: descripción del género y características generales

*P. aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo, aerobio y anaerobio facultativo, no fermentador y perteneciente a la familia *Pseudomonaceae* (47). Suelen presentar una morfología recta o ligeramente curvada, con un tamaño de 1,5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Este bacilo con motilidad unipolar debido a la presencia de un flagelo, puede presentar además unas proyecciones externas filiformes de estructura proteica, denominadas pili o fimbrias, que están relacionadas con su capacidad de adherencia a las células del hospedador.

En cultivo, crecen sin dificultad en cualquier medio. La temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria es 37°C, pero puede crecer a temperaturas superiores. Son oxidasa y catalasa positiva. Se diferencian de otras especies por la producción de ácidos a partir de glucosa y xilosa, y por transformar el nitrato a nitrito o gas. Algunas cepas tienen un aspecto mucoide por la abundancia de una cápsula de polisacárido, y muchas cepas producen pigmentos, como la piocianina, pioverdina y piorrubina, que pueden ser tóxicas las células eucariotas, actuando sobre el ciclo Redox de la respiración celular (42).

Considerada como una de las bacterias más versátiles desde el punto de vista metabólico, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de colonizar múltiples ambientes. Se puede encontrar en la microbiota, en el suelo, agua, superficies de materiales quirúrgicos, e incluso en algunos antisépticos. La capacidad de sobrevivir en cualquier ambiente con los requerimientos nutricionales mínimos (69) lo han convertido en uno de los patógenos oportunistas más exitosos (70).

Aunque los seres humanos están en contacto frecuente con *P. aeruginosa*, las infecciones graves ocasionadas por este microorganismo rara vez son adquiridas por pacientes inmunocompetentes; no obstante, cuando se alteran las barreras de la piel y mucosas, frente a estados de inmunodepresión, puede actuar como patógeno primario (71). *P. aeruginosa* es una causa importante de infecciones tanto adquiridas en la comunidad como en el hospital. Las infecciones adquiridas en la comunidad incluyen, pero no se limitan a, queratitis ulcerativa (generalmente asociada con el uso de lentes

de contacto), otitis externa e infecciones de la piel y tejidos blandos (incluyendo infecciones del pie diabético). Los pacientes hospitalizados pueden estar colonizados con *P. aeruginosa* en el momento del ingreso o pueden adquirir el microorganismo durante su estancia hospitalaria. Las infecciones nosocomiales causadas por *P. aeruginosa* incluyen neumonías, infecciones del tracto urinario, bacteriemia, infecciones del sitio quirúrgico e infecciones de la piel en el contexto de lesiones por quemaduras (72, 73). Las infecciones oportunistas causadas por *P. aeruginosa* no sólo son de las más comunes, sino que también se han asociado con una alta morbilidad y mortalidad. Por otro lado, también son motivo de preocupación la elevada resistencia a los antimicrobianos observada en la mayoría de aislamientos de origen nosocomiales (73).

### **1.6.1 Epidemiología**

*P. aeruginosa* juega un papel particularmente importante en las UCIs, donde es el microorganismo responsable de un alto porcentaje de las infecciones nosocomiales (13-22%). Este microorganismo se ha identificado en hasta el 13% de todas las infecciones nosocomiales de las cuales se ha podido identificar el agente causal (73). Por otro lado, numerosos estudios destacan la importancia de *P. aeruginosa* en la colonización de pacientes con FQ, EPOC y bronquiectasias, en quienes la colonización bronquial, además de las infecciones recurrentes, son frecuentemente causadas por este microorganismo (74).

Es un patógeno importante en la colonización de la herida en pacientes con quemaduras y en pacientes con inmunodeficiencias primarias (IDP) y adquiridas, siendo considerado como una de las principales causas de septicemia y de bacteriemia en pacientes con IDP y leucemia aguda, respectivamente. Además, es el patógeno mayormente aislado en pacientes con infección por VIH hospitalizados y con neumonía (73). En Europa y la región Mediterránea, *P. aeruginosa* representa el 20,9% de los organismos Gram negativos aislados en pacientes con NAH y NAV, además de presentar una susceptibilidad reducida a la mayoría de los antimicrobianos (75).

### **1.6.2 Factores de virulencia**

*P. aeruginosa* presenta componentes estructurales, así como toxinas y enzimas secretadas, que están involucrados en la patogénesis y son responsables de causar daño tisular y favorecer la lisis celular, así como su diseminación por el torrente sanguíneo (69). Cuando *P. aeruginosa* se une a las células epiteliales puede activarse el sistema de secreción tipo III (SSTT) que permite la liberación de ciertas proteínas efectoras dentro de la célula epitelial, con la consiguiente alteración en la respuesta inmunitaria, lesión y muerte celular (42). La tabla 2 recoge los principales determinantes de virulencia que intervienen en la patogénesis de la infección por *P. aeruginosa*.

**Tabla 2.** Principales factores de virulencia conocidos de *P. aeruginosa*. Tomado de (42, 76)

Factores de virulencia	Función y efecto de su actividad para el patógeno y/o el hospedador
<b>Componentes estructurales</b>	
Flagelos	Motilidad
Pili y fimbrias	Adherencia y motilidad
Lipopolisacáridos	Actividad endotóxica
Alginato	Creación de capa mucóide y actividad antifagocitaria
<b>Enzimas y toxinas secretadas</b>	
Proteasas (elastasa, proteasa alcalina)	Citotoxicidad celular, inhibición de la quimiotaxis y daño tisular
Ramnolipido	Invasión tisular
Exotoxina A	Altera la síntesis proteica y actividad inmunosupresora
Exoenzima S y T	Atividad citotóxica e inmunosupresora y necrosis tisular
Lipasas y Fosfolipasas	Citotoxicidad tisular
SSTT <sup>a</sup>	Citotoxicidad celular
Piocianina	Apoptosis de neutrófilos y estrés oxidativo
Pioverdina	Sideróforo necesario para la patogénesis

a) SSTT: Sistema de secreción tipo III

### 1.7 Mecanismos de adaptación al tracto respiratorio inferior

Los patógenos oportunistas que habitan de forma asintomática o que causan ITRI han ido evolucionando y adaptándose a los mecanismos de defensa sofisticados de la mucosa pulmonar del hospedador, a la terapia antimicrobiana y a la coexistencia con otras especies. Algunas de estas bacterias comparten nichos ambientales similares, además de numerosas estrategias de adaptación (14, 77).

Como se ha mencionado anteriormente, *S. aureus* y *P. aeruginosa* son patógenos humanos oportunistas que frecuentemente coexisten en las comunidades bacterianas de pacientes con enfermedad pulmonar crónica. La convivencia y adaptación entre estos dos microorganismos en un mismo nicho requiere del desarrollo de estrategias que incluyen cambios fenotípicos como la producción de exopolisacáridos (EPS), formación de *biofilm*, pérdida de la motilidad, formación de variantes de colonia pequeña (SCV, del inglés *Small Colony Variant*), así como cambios genéticos que están reflejados en el aumento de las tasas de mutación, activación de los mecanismos de comunicación célula a célula (ver sección 1.7) y en la expresión de determinados factores de virulencia (7, 14).

Muchos de los patógenos oportunistas que colonizan de forma persistente las vías respiratorias inferiores utilizan como estrategia la disminución en la producción de los factores de virulencia y de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP del inglés, *pathogen associated molecular patterns*) para evitar la detección y acción del sistema inmune del hospedador (7).

### **1.7.1 Formación de *Biofilms***

Una de las estrategias que favorece la colonización y que está relacionada con la adaptación de estos microorganismos, principalmente en los pulmones de pacientes con FQ, pero también de forma prominente en los casos que implican el uso de dispositivos médicos permanentes o por largos periodos, como las cánulas de traqueostomía, o el TE en los pacientes sometidos a VM, es la formación de *biofilm*.

El proceso de formación de *biofilm* es multifactorial, incluyendo señales ambientales y redes reguladoras, constituyendo en sí un modo de crecimiento único que permite la supervivencia y la persistencia de estos microorganismos en ambientes hostiles (78).

El *biofilm* es una comunidad microbiana de células que se unen a un sustrato (biótico o abiótico), encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, y que exhiben un fenotipo alterado con respecto al crecimiento, metabolismo y expresión génica (79-81). La formación de *biofilm* parece estar íntimamente relacionada con la respuesta a las condiciones ambientales hostiles que activan ciertas vías moleculares permitiendo al microorganismo una adaptación favorable al estilo de vida multicelular. La combinación entre el estrés ambiental del entorno clínico (limitación de nutrientes y oxígeno, y presión antibiótica entre otros) y los mecanismos adaptativos de defensa de las células planctónicas (libres), propician el desarrollo de estructuras multicelulares resistentes a la respuesta inmune y la acción de los agentes antimicrobianos (82).

El desarrollo de *biofilm* está implicado en muchas infecciones crónicas (endocarditis, otitis media, osteomielitis, rinosinusitis, FQ) e infecciones basadas en implantes (válvulas cardíacas protésicas, catéteres intravenosos, prótesis ortopédicas) (83). Estas infecciones en concreto, tienen una especial relevancia clínica debido a que generalmente ofrecen una mayor resistencia a la terapia antibiótica (84) y a la acción del sistema inmune (80), además de representar un reservorio para la diseminación del microorganismo a otros órganos. En cuanto a la NAV, como se ha mencionado anteriormente, la presencia del TE y la posterior formación de *biofilm* sobre él, facilita la movilidad de los microorganismos presentes en la microbiota orofaríngea (27).

De forma general, el proceso de formación de *biofilm* ocurre en tres etapas distintas: (a) adhesión inicial de los microorganismos a la superficie y formación de agregados multicelulares, (b) proliferación y maduración, y (c) dispersión (84) (Figura 2).

### a) Adhesión

La adhesión es una etapa importante en el establecimiento del *biofilm*, donde las células planctónicas adoptan el estilo sésil, y producen un gran número de moléculas de adhesión y de superficie. Inicialmente, la adhesión depende del transporte de las bacterias a una superficie. En el caso de *S. aureus*, que son bacterias no motiles, este transporte ocurre de manera pasiva. Se observa la implicación de moléculas de superficie bacterianas específicas en esta etapa del proceso (85). Sin embargo, en *P. aeruginosa* este transporte es activo debido a su capacidad de motilidad. Se ha visto que los flagelos y las fimbrias de tipo I y IV ayudan a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas (86).

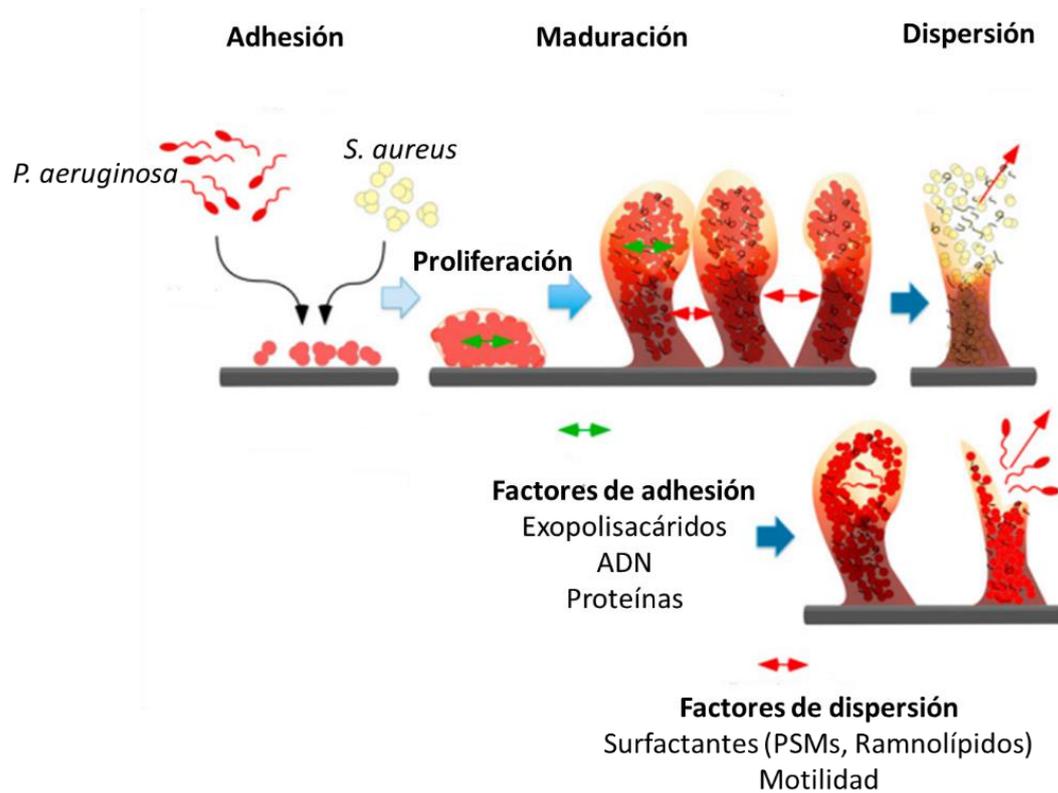
### b) Proliferación y maduración

Una vez las bacterias se han establecido en la superficie, estas empiezan a acumularse en masa, produciendo la matriz y construyendo la arquitectura propiamente conocida como *biofilm*. Estos *biofilms* pueden llegar a tener una apariencia, vista al microscopio, de torres celulares en forma de seta que rodean canales llenos de líquido (84).

La composición del EPS, que es el componente principal de la matriz, es diferente en función de la bacteria considerada. En el *biofilm* formado por *P. aeruginosa* de fenotipo mucoide se observa una elevada producción de alginato, a diferencia del *biofilm* de *S. aureus*, que mayoritariamente suele ser de poly-N-acetilglucosamina, también referido como Adhesina Intracelular de Polisacárido (PIA, por sus siglas en inglés). En ambos casos, a parte de la matriz del *biofilm*, también se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias.

### c) Dispersión

Estando totalmente formado, las microcolonias que componen el *biofilm* pueden segregarse, ya sea por medio de procesos mecánicos, por el cese de la producción de material como los EPS, o bien a través de la solubilización de la matriz, promoviendo así la dispersión de pequeños grupos de células, que colonizarán nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del *biofilm*. Esta etapa depende de factores disruptivos reconocidos como agentes surfactantes. La fuerte producción de surfactantes, que son controlados mediante la comunicación célula a célula, conducen al desprendimiento del *biofilm*. En el caso de *P. aeruginosa*, la regulación positiva de la motilidad también ayuda a la dispersión (87).



**Figura 2.** Etapas de la formación de *biofilm*. Factores relacionados con la adhesión y proliferación, maduración y dispersión ejemplificado tanto para *S. aureus* como para *P. aeruginosa*. Modificado de (87).

### 1.7.2 Persistencia bacteriana

En los últimos años se ha extendido la evidencia de que patógenos como *S. aureus* y *P. aeruginosa*, reconocidos como microorganismos clásicamente extracelulares, pueden sobrevivir en el interior de las células eucariotas, una vez que han sido fagocitados (88). Este estilo de vida intracelular facilita la persistencia bacteriana a largo plazo (89), además de constituir un nuevo nicho que les protege de los mecanismos de defensa humoral y celular del hospedador, así como de los tratamientos antimicrobianos de acción extracelular (14, 77). Al mismo tiempo, esta estrategia les favorece como patógenos intracelulares oportunistas, pues constituye un reservorio para las infecciones crónicas (90), y facilita la diseminación e infección a órganos distantes al foco de infección aguda (metástasis sépticas), utilizando de esta manera las células fagocíticas (neutrófilos) a modo de caballo de Troya (91).

Entre las diferentes estrategias desarrolladas por estos microorganismos durante el ciclo de vida intracelular, se destaca la capacidad de escapar del fagosoma, así como la inhibición de la formación del fagolisosoma (92), que han sido descritas en modelos de infección on células no fagocíticas (epiteliobronquial como células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) (88, 93-97).

Por otro lado, las infecciones crónicas están generalmente asociadas con fenotipos bacterianos alterados, como las SCV. Mayoritariamente descrito en *S. aureus*, pero también presente en *P. aeruginosa*, este fenotipo representa una subpoblación de bacterias de crecimiento lento, metabolismo reducido y alteración del perfil de susceptibilidad antibiótica (14). Este fenotipo está adaptado para persistir a largo plazo en las células del hospedador, ya que las bacterias pueden sobrevivir dentro de las células durante largos periodos de tiempo sin desencadenar una respuesta inflamatoria (98). Estudios recientes demuestran que la coinfección con *P. aeruginosa* en FQ favorece la selección de SCV de *S. aureus*. Este hecho, además de plantear dificultades diagnósticas, conlleva a una mayor resistencia a los antibióticos y una mayor capacidad de persistencia en las vías respiratorias de estos pacientes (17).

Durante la persistencia bacteriana, los microorganismos no sólo cambian su fenotipo a SCV (98), sino que también alteran la regulación y expresión de los factores de virulencia (99). En *S. aureus*, la acción de sistemas reguladores globales que actúan reduciendo la expresión de exotoxinas secretadas, a la vez que aumentan la producción de proteínas de superficie, favorecen la persistencia bacteriana y la cronicidad de la infección (93).

En cuanto al papel que juegan los antibióticos, en el desarrollo de SCV, se ha descrito que su acción puede modificar la expresión de genes que están relacionados con la transición al estilo de vida intracelular (14). Además, muchos de los antibióticos prescritos durante las ITRI no alcanzan concentraciones elevadas en el tejido pulmonar o tienen actividad insuficiente si la bacteria se encuentra en una localización intracelular (100). Añadido a este factor, también está el hecho de que incluso cuando se prescribe una terapia ajustada al antibiograma, la estructura del árbol traqueobronquial, ya sea debido a colapso o formación de edemas, presenta determinadas áreas que son inaccesibles a la entrada de los antimicrobianos y por lo tanto presentan una menor eficacia (14).

Por lo tanto, de forma conjunta los mecanismos de adaptación al tracto respiratorio por parte de las bacterias y las características anatómicas del tracto respiratorio, acaban proporcionando un nicho perfecto para estos microorganismos, que a su vez sirve como un reservorio que favorece la selección de mutantes resistentes (101).

### **1.8 Sistemas de regulación mediados por la percepción del quorum (*Quorum Sensing*)**

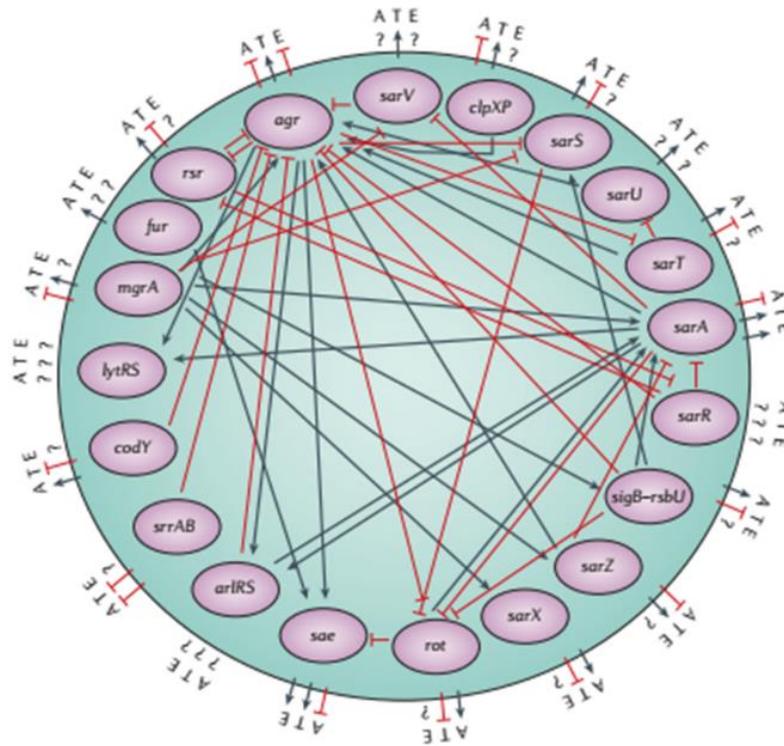
Los organismos unicelulares procariontes, como las bacterias, pueden interactuar entre sí por medio de una red formada por señales químicas, que sincronizan la actividad célula a célula, y que es capaz de alterar el entorno y el comportamiento de toda una población o comunidad en respuesta a los cambios inducidos por estas moléculas (102). El hecho de que las bacterias utilizan moléculas señal para comunicarse viene siendo investigada desde la década de los 60, donde se observó que la capacidad de *S. pneumoniae* para integrar ADN extracelular como parte de su material genético, ocurría

en estadios fisiológicos particulares relacionados con la densidad poblacional o quorum (103, 104). Este sistema de comunicación de célula a célula, condicionado por la densidad poblacional, es denominado en inglés como *quorum-sensing* (QS) y fue descrito inicialmente en *Photobacterium fischeri*, una especie de bacteria marina luminiscente, que regula los mecanismos de producción de luz y otros procesos, por medio de la densidad celular (105, 106). La comunicación entre células por medio de la densidad o el quorum depende en gran medida del entorno en el cual el organismo se encuentra o está creciendo. Además, se encuentra bajo la influencia está de reguladores adicionales que responden a señales distintas de la densidad celular (107).

El sistema de QS consiste en la producción, liberación, detección y respuesta a moléculas de bajo peso molecular, que actúan como señales, y son conocidas como moléculas auto inductoras (AIs) (108). Las AIs se producen a niveles basales y su concentración aumenta con el crecimiento de la población bacteriana. Como son moléculas que pueden difundir a través de las membranas, su concentración dentro de las células se aproxima a la concentración extracelular. Al alcanzar una determinada concentración los AIs pueden unirse y activar receptores específicos intracelulares o anclados en las membranas de las células bacterianas, alterando a su vez los patrones de transcripción en una población local mediante cascadas de señalización (109).

Durante años, se pensó que este sistema de control estaba limitado a unos pocos microorganismos marinos, pero actualmente es ampliamente reconocido que muchas especies de bacterias utilizan el QS como parte de su mecanismo regulador (110). Se han descrito muchas clases de moléculas AIs. En los organismos Gram positivos, como *S. aureus*, estas moléculas señal son péptidos, conocidos en inglés como *auto-inducing peptides* (AIPs), que se unen a receptores de membrana específicos, poniendo en marcha un sistema de transducción de señales de dos componentes (TCRS, del inglés *two-component regulatory system*), que permite al microorganismo alterar su perfil de expresión génica en respuesta a estímulos ambientales (111). Este TCRS está formado por una quinasa sensora de la membrana y un regulador de respuesta citoplasmático que activa una cascada de fosforilación que resulta en la represión o activación de genes diana, algunos de ellos involucrados en la síntesis del propio AIP (108).

*S. aureus* es un claro ejemplo dentro de las bacterias Gram positivas, que utiliza el QS como mecanismo regulador global. Su gran capacidad de adaptación a diversos ambientes queda reflejada por la presencia y la cantidad de redes reguladoras diferentes y complejas (Figura 3) que intervienen de forma general en la expresión de genes involucrados en la virulencia, el metabolismo, la evasión de la respuesta inmune y actividad antimicrobiana de este microorganismo (111).



**Figura 3.** Representación de las interacciones conocidas sobre la regulación de la virulencia en *S. aureus*. Dentro del círculo se encuentran los genes reguladores que tienen efecto el uno sobre el otro y sobre la virulencia. Fuera del círculo están los efectos conocidos de cada regulador sobre la capacidad de adhesión celular (A), toxicidad (T) y evasión de la respuesta inmune (E). Líneas rojas indican que reprimen la expresión/producción; líneas azules indican que inducen la expresión/producción. El signo de interrogación indica que no hay información sobre la actividad directa del regulador o la información disponible es contradictoria. Tomado de (112).

En *S. aureus* la expresión de los productos génicos parece estar controlada por varios TCRS, que a su vez son activados a través de diferentes estímulos, a parte de la detección de la concentración del AIP, como por ejemplo la alteración del pH, la concentración de los nutrientes y del CO<sub>2</sub> (113); así como también la detección de la densidad poblacional bacteriana, la fuerza iónica y el estrés de la membrana (111). La detección de estas señales controla de diferentes maneras los sistemas reguladores, que a su vez inducen o reprimen la producción de los factores de virulencia que pueden encontrarse unidos a la superficie celular del microorganismo o bien ser secretados en el medio, favoreciendo así la colonización (evasión de la respuesta inmune y adhesión celular), o bien el desarrollo y diseminación de la infección (destrucción de las células y/o matriz celular) (62, 114).

El TCRS mejor estudiado y caracterizado en *S. aureus*, que describiremos en detalle más adelante (sección 1.8.1), es el AgrCA. Como se muestra en la Figura 3, este es el TCRS con más interconexiones en la red de regulación global. Pero también se han descrito otros TCRS que regulan la expresión de genes de virulencia, resistencia a los antibióticos, el metabolismo de la pared celular, la respiración bacteriana y la detección de nutrientes (111). Entre ellos destacan algunos que también están representados en la Figura 3:

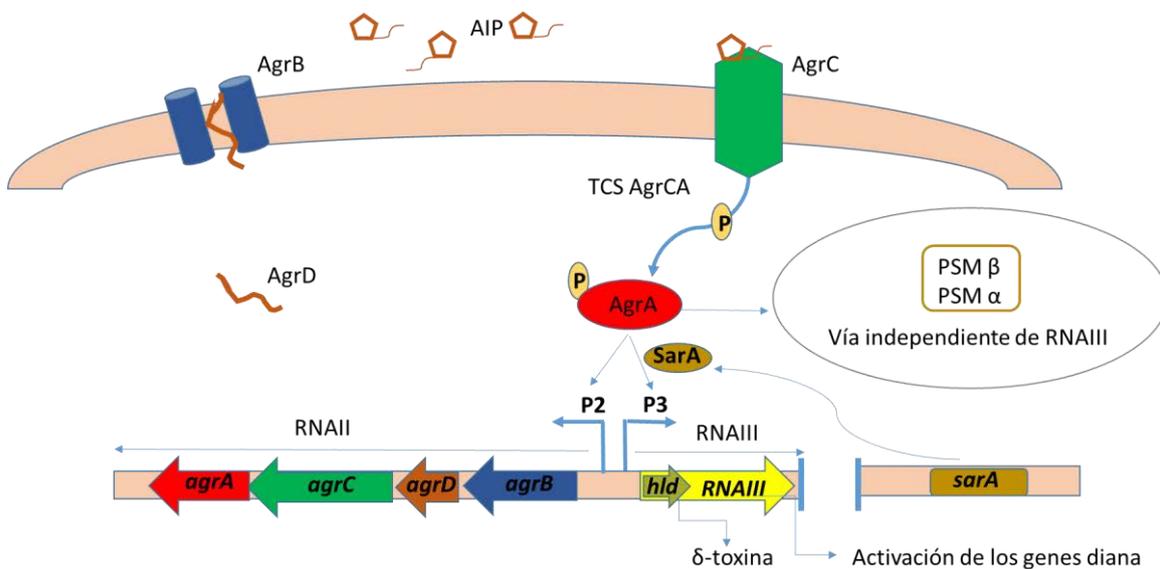
- SaeRS - Se ha propuesto que el locus *sae* (*S. aureus exoprotein expression*) responde a varios estímulos ambientales, incluyendo el alto contenido en sal, la alteración del pH y glucosa, y las concentraciones subinhibitorias de antibióticos (115), secretando factores mayormente relacionados con la evasión del sistema inmune (111). Este sistema es esencial para la transcripción de los genes *hla* ( $\alpha$ -hemolisina) y *hly* ( $\beta$ -hemolisina) (113).
- ArlRS (*Autolysis-related locus*) - Parece contrarrestar la autoinducción del sistema *agr* (*accessory gene regulator*), reprimiendo la producción de hemolisinas y exoenzimas. Además, podría actuar en la regulación de la actividad autolítica, en el proceso de crecimiento y división celular, así como en la bomba de eflujo NorA de *S. aureus* para múltiples fármacos (116, 117).
- SrrAB (*Staphylococcal respiratory response*) o *srhSR* – Actúa en la regulación de los genes involucrados en el metabolismo energético (respiración aerobia y anaerobia) y de los genes que son influenciados por las condiciones ambientales de oxígeno (118).
- LytRS - Regula la actividad autolítica así como el ArlRS (119). Está relacionado con el aumento de la actividad mureína hidrolasa y el desarrollo de *biofilm* (111).
- *vfrAB* \_ Operón recién identificado que podría activar la producción de  $\alpha$ -hemolisina y reprimir la actividad de proteasasa nivel post-transcripcional (120).
- WalRK – Actúa sobre el metabolismo de la pared celular. Regula los genes implicados en la autólisis. Parece tener un papel importante en el cambio de estilo de vida de *S. aureus* entre comensal y patógeno (111).
- NreCBA – Actúa sobre la asimilación de nitrógeno (111).
- PhoPR - Actúa sobre la asimilación de fosfato (111).
- KdpED - Regula el transporte de potasio (111).
- VraSR, GraXSR y BraRS - Actúan en la regulación de la resistencia a los antibióticos (111).

### **1.8.1 Sistema regulador de dos componentes Agr**

Dentro del género *Staphylococcus* el sistema de QS mejor estudiado es el codificado por el operón *agr* (*accessory gene regulator*), también conocido como sistema Agr, que controla no sólo la expresión de un conjunto de genes de virulencia (121) sino que también es un factor determinante de la evolución, diversificación y especiación dentro del género (122, 123).

El sistema Agr, codifica un circuito típico de auto activación, cuya estructura fue descrita y caracterizada por el grupo de Richard P. Novick (Figura 4) (124, 125). De forma resumida, la transcripción del locus está coordinada a partir de 2 promotores divergentes (P2 y P3), de los cuales P2 promueve la producción del RNAII que cubre la transcripción de un operón formado por 4 genes: *agrB*, *agrD*, *agrC* y *agrA*, y el P3 que dirige la transcripción del RNAlII, la molécula efectora y reguladora del sistema, que además se traduce en la proteína  $\delta$ -hemolisina ( $\delta$ -toxina). Los péptidos AgrB y AgrD se

combinan para generar la molécula “ligando” de activación, el AIP. AgrB es una proteína multifuncional que modifica la estructura del AIP, además de estar implicada en su exportación. Las proteínas AgrC y AgrA constituyen propiamente el sistema regulador de dos componentes (TCRS-AgrCA) formado por el receptor quinasa de la membrana AgrC y el regulador de la respuesta citoplasmática AgrA. AgrC es el encargado de transmitir la señal desde la membrana plasmática hasta la molécula reguladora de la respuesta transcripcional AgrA. La molécula AgrA, a nivel citoplasmático, induce la transcripción de los promotores P2 y P3, que a su vez promoven la reactivación del sistema y la transcripción y traducción del RNAIII, respectivamente. De esta manera el polipéptido AgrA “auto estimula” su propio promotor retroalimentando el circuito, además de activar una vía independiente del control de la molécula efectora RNAIII, que está implicada en la producción de PSMs  $\alpha$ - y  $\beta$  (126).



**Figura 4.** Sistema Agr en *S. aureus* y mecanismos de regulación de su actividad. AgrD es un propéptido procesado por AgrB en la molécula autoinductora AIP. AgrC transmite la señal inductora del AIP hasta el AgrA, que una vez fosforilada actúa sobre los promotores divergentes (P2 y P3) induciendo junto con la proteína SarA, la transcripción de RNAIII y la expresión del operón *agrBDCA*, con lo que se produce la reactivación del sistema. Por otro lado, AgrA también es responsable de la transcripción de otras dianas, como los promotores PSM  $\beta$  y  $\alpha$ . La molécula efectora RNAIII actúa modulando la expresión génica de la mayoría de los genes de virulencia regulados por el sistema Agr y también codifica la  $\delta$ -hemolisina ( $\delta$ -toxina).

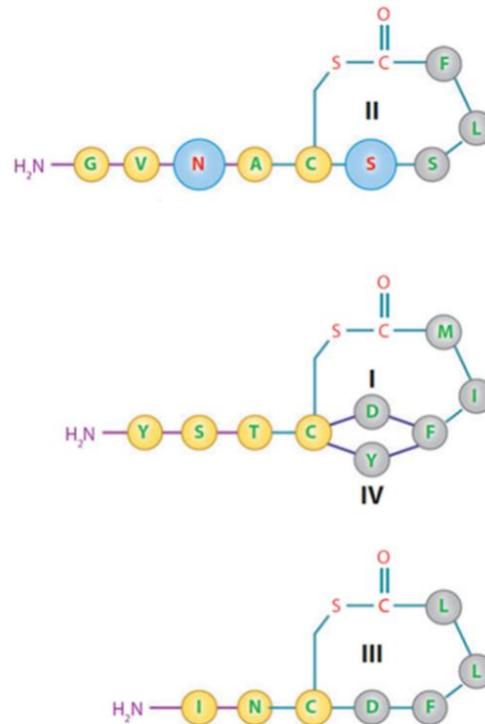
Un circuito similar de sistemas de regulación, basados en la auto-activación por péptidos, es utilizado por la mayoría o casi todos los organismos Gram positivos. Sin embargo, el sistema Agr estafilocócico parece ser el único que utiliza un RNA regulador, el RNAIII, como molécula efectora en lugar de la respuesta reguladora del péptido AgrA (108).

El RNAIII es una molécula de RNA codificada por el promotor P3 (Figura 4), está formada por 514 nucleótidos y adopta una estructura secundaria y terciaria compleja (127). Se trata de una molécula muy estable, abundante y con una vida media superior a 45 minutos que regula la funcionalidad del sistema Agr. Su nivel de expresión máxima ocurre al final de la fase del crecimiento estacionario (128). El RNAIII es una molécula bifuncional, actúa como un RNA mensajero (mRNA) que codifica un péptido anfipático de 26 aminoácidos, la  $\delta$ -hemolisina (también conocida como PSM- $\gamma$ ) (129), y a la vez modula la expresión de numerosos genes, ya sea por medio de una regulación directa (interaccionando con la proteína y promoviendo la traducción de un determinado factor de virulencia) o a través de la inhibición de la traducción del represor de toxinas *rot* (130). Los niveles elevados de RNAIII están asociados con el aumento de la producción de numerosas exotoxinas (leucocidinas, enterotoxinas y  $\alpha$ -toxina), así como de exoenzimas (serinas, lipasas y cisteína) (131) (Tabla 3). La expresión de los diferentes genes diana es regulada por partes específicas de la molécula RNAIII. Por ejemplo, el fragmento 3' del RNAIII reprime la expresión de la proteína A y de la coagulasa, mientras que el fragmento 5' estimula la traducción de  $\alpha$ -hemolisina. Además, el RNAIII regula numerosos TCRS y reguladores globales (*arl*, *sae*, *srr*, *rot*), genes que están implicados en la formación e integridad del *biofilm*, metabolismo de los peptidoglicanos y aminoácidos, y sus vías de transporte (128).

#### 1.8.1.1 Alelos del locus *agr*: actividad del AIP

La secuencia del operón *agr* no es la misma en todas las cepas de *S. aureus*. El polimorfismo de la región *agr* B-D-C, da lugar a cuatro grupos principales de *agr* (I-IV) y que presentan además diferentes dinámicas de funcionamiento (123). La nomenclatura de estos grupos se designa por la abreviación del gen, locus o molécula autoinductora seguida del número romano. Por lo tanto, *agrD*-I y AIP-I se refieren al grupo de genes y molécula autoinductora del *agr* grupo I respectivamente, y así sucesivamente (115).

El AIP proviene del propéptido codificado por el gen *agrD*, que a través de la enzima SpsB (*Signal Peptidase I*) y del AgrB, una endopeptidasa transmembrana, es procesado y secretado en un péptido de 7–9 aminoácidos que contiene un anillo de tiolactona en su estructura, esencial para su actividad. El AIP es producido y secretado durante la fase exponencial del crecimiento, y fuera de la célula se acumula alcanzando concentraciones de hasta 10  $\mu$ M (130). Los AIPs codificados por cada uno de los cuatro alelos *agr* presentan una región conservada, pero sus longitudes y otras regiones de sus secuencias son diferentes, lo que resulta en la especificidad de cada grupo (108) (Figura 5). De esta manera AgrB-I procesa AgrD-I, AgrB-II procesa AgrD-II y así sucesivamente.



**Figura 5.** Estructura de los AIPs (I-IV) de *S. aureus*. El AIP II es un nonapéptido, mientras que el AIP III es un heptapéptido. Los AIP I y IV son octapéptidos que difieren en un único aminoácido: D para el AIP I; Y para el AIP IV. La estructura lineal del AIP es necesaria para la activación del sistema Agr, mientras que el anillo tioactona es requerido tanto para la activación como para la inhibición. Tomado de (108).

Curiosamente, cada grupo según el tipo de alelo *agr*, produce un AIP que es capaz de unirse y activar al receptor AgrC de las cepas que pertenecen al mismo grupo (locus *agr* homólogo) (115, 132). Sin embargo, un AIP producido por un grupo específico, es capaz de unirse también al receptor de los demás grupos, pero en este caso inactivando o bloqueando la vía de señalización y la expresión génica de las cepas pertenecientes a otros grupos *agr* (locus *agr* heterólogo) (122). De las cuatro moléculas de AIP, el AIP I y IV están más relacionados entre sí y difieren por un sólo aminoácido en la posición 4, presentando cierta reacción cruzada con sus receptores AgrC afines. Sin embargo, las diferencias entre las secuencias de los péptidos AIP I/IV, II y III permiten que estas moléculas funcionen como antagonistas, inhibiendo la activación del AgrC (109, 133).

Hay diferentes teorías sobre la evolución de los diferentes grupos de *agr*, pero se cree que hubo un ancestro común y que, a lo largo de la evolución la divergencia entre los grupos I y IV fue más reciente (108). En relación a la cinética de funcionamiento, se observan diferencias en el tiempo de activación para cada grupo. En las cepas del grupo *agr* IV este sistema se activa una vez que éstas entran en fase exponencial, mientras que en las cepas del grupo *agr* III, no se activa hasta después de 3-4 horas de la fase post-

exponencial. De esta manera cada alelo *agr* se activa y regula los genes diana en momentos distintos durante la fase de crecimiento (108, 123). Otra característica es que algunos componentes del suero (plasma) humano como la Apolipoproteína B es capaz de unirse a determinados tipos de AIPs, interviniendo así en la virulencia a través de la disminución de la actividad del Sistema Agr (134-136).

#### 1.8.1.2 Regulación del sistema Agr

La regulación del sistema Agr ocurre por medio de una red compleja de genes, que actúan directa o indirectamente, aumentando o disminuyendo su actividad (108). El sistema Agr es regulado por dos vías diferentes en *S. aureus*. La primera, como se ha mencionado anteriormente, consiste en la auto activación a través del polipéptido AgrA, que retroalimenta el circuito (Figura 4). La segunda es una forma de regulación que ocurre por medio de un TCRS formado por una molécula auto inductora reconocida como RAP (del inglés *RNAIII-activating protein*) y su molécula diana TRAP (del inglés *Target of RNAIII Activating Protein*), una proteína de 21 kDa y 167 aminoácidos (137). Juntos constituyen una vía de activación adicional del AgrCA. La proteína RAP, codificada por el gene *rpIB*, es secretada durante todas las fases del crecimiento bacteriano siendo capaz de fosforilar y activar el sistema TRAP (113). La fosforilación en la fase exponencial tardía de TRAP es capaz de aumentar la adhesión celular y a la vez activar el sistema Agr (138).

A parte de estas dos vías de regulación, se puede encontrar también actuando como represores o inductores de la actividad del sistema Agr, y consecuentemente de muchos factores de virulencia, determinadas proteínas reguladoras que se unen al RNA (139) o al DNA, como es el caso de la familia de proteínas codificadas por el locus *sarA* (*staphylococcal accessory regulator*) y sus homólogos (*sarR*, *sarS*, *sarT*, *sarU* y *rot*) (113), y del factor de transcripción Sigma  $\beta$  (140).

#### 1.8.1.3 Funcionalidad del sistema Agr

El QS vía *agr* tiene un papel importante en la patogénesis estafilocócica, especialmente en *S. aureus* (107). Por medio de la actuación conjunta con otras proteínas reguladoras y la respuesta a los cambios ambientales, el sistema Agr contribuye a la progresión de la infección estafilocócica, coordinando la represión del crecimiento bacteriano y la producción de proteínas de superficie celular (proteína A, coagulasa, fibronectina) con el aumento de exoproteínas ( $\alpha$ -toxina,  $\beta$ -hemolisina, TSST-1, leucotoxinas) durante la fase post-exponencial (113, 141).

La detección del quórum es baja en el inicio del proceso de colonización, y los estafilococos presentes en pequeñas cantidades y en fase exponencial de crecimiento expresarían aquellos factores de virulencia relacionados con el establecimiento del microorganismo en el nicho determinado, como son las proteínas de adhesión o las

proteínas de la pared celular. En cambio, en la fase post-exponencial, cuando en el ambiente se agotan los nutrientes debido al aumento poblacional, y la expresión de RNAlII se ve aumentada, el microorganismo incrementaría la producción de los factores de virulencia secretados que están más relacionados con la invasión y la toxicidad, mediante las toxinas y proteasas, que le permitiría al microorganismo diseminarse a través de los tejidos del hospedador (99, 107).

La activación o funcionalidad del sistema Agr parece cambiar esencialmente el estado de *S. aureus*, de adherente y colonizador comensal a un patógeno invasivo y virulento (142). Un estudio ha demostrado que el sistema Agr participa en la activación de más de 100 genes relacionados con la virulencia, mientras que otros 34 genes son reprimidos (121). En la Tabla 3 se listan algunos de estos genes regulados por el sistema Agr.

**Tabla 3.** Ejemplos de genes o clúster de genes de virulencia regulados por el sistema Agr. Tomado de (64, 65, 113, 115).

Gen o clúster de genes	Proteína	Regulación por <i>agr</i>	Función y efecto de su actividad para el patógeno y/o el hospedador
<i>cap5</i> , <i>cap8</i>	Polisacárido capsular serotipo 5 y 8	+	Actividad antifagocitaria, adhesión. Inhibe la quimiotaxis
<i>spa</i>	Proteína A	-	Dificulta la opsonización, activa el complemento y bloquea la porción Fc de las IgG
<i>fnbA</i> , <i>fnbB</i>	Proteína de unión a la Fibronectina A y B	-	Adhesión a la fibronectina. Favorece la adhesión a los tejidos
<i>hla*</i>	$\alpha$ - hemolisina	+	Inductor de autofagia. Muerte celular de leucocitos
<i>hlb</i>	$\beta$ -hemolisina	+	Desestabiliza la membrana plasmática y permite el escape fagosomal
<i>hld*</i>	$\delta$ - hemolisina	+	Hemolítica y surfactante
<i>hlgA*</i>	$\gamma$ - hemolisina	+	Hemolítica y citotóxica
<i>lukS/F--PV*</i>	Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL)	+	Actividad leucotóxica
<i>tst</i>	Toxina del Síndrome del shock tóxico-1(TSST-1)	+	Actúa como superantígeno. Provoca el síndrome del shock tóxico
<i>seb</i>	Enterotoxina B	+	Actúa como superantígeno. Provoca la intoxicación alimentaria

Gen o clúster de genes	Proteína	Regulación por <i>agr</i>	Función y efecto de su actividad para el patógeno y/o el hospedador
<i>eta</i> , <i>etb</i>	Toxina Exfoliativa A y B	+	Serina proteasa. Provoca el síndrome de la piel escaldada
<i>sspA</i>	V8 serina proteasa	+	Factor de crecimiento.
<i>sak</i>	Estafiloquinasa	+	Activador de plasminógeno. Evasión del complemento y aumento de la actividad proteolítica
<i>chp</i>	<i>Chemotaxis inhibitory protein of S. aureus</i> (CHIPS)	-	Inhibe la quimiotaxis
<i>scn</i>	<i>Staphylococcal complement inhibitor</i> (SCN)	+	Evasión del complemento y dificulta la fagocitosis

\*Toxinas formadoras de poros en las membranas plasmáticas; +, induce la expresión; -, reprime la expresión.

#### 1.8.1.4 Implicaciones clínicas del sistema Agr

##### **Patogénesis**

Pese a que la actividad del sistema Agr ha sido ampliamente estudiada en modelos animales, en lo que respecta a la clínica, su funcionalidad todavía no está bien definida. Estudios experimentales demuestran que la disfunción del sistema Agr tiene un papel importante en la colonización de dispositivos médicos (141), así como en el desarrollo de bacteriemia persistente (143, 144) asociada a mal pronóstico clínico (145) y a la formación de *biofilm* (83, 146). Además, los aislados provenientes de infecciones de origen hospitalario, sometidos a presión antibiótica, son frecuentemente Agr mutantes o Agr disfuncionales, con un porcentaje que varía del 15% a 60%, cuando se compara con los aislados de origen comunitario (147).

En cuanto a la correlación epidemiológica entre determinados alelos o grupos *agr* y algunas enfermedades, en la literatura se encuentran descritas diferentes asociaciones. Se observan asociaciones entre el *agr* del grupo III y el Síndrome del *shock* tóxico (148), entre aislados clínicos pertenecientes al *agr* del grupo IV y el síndrome exfoliativo, y entre las cepas *agr* I y II y las infecciones supurativas e endocarditis (149). Del mismo modo se describen que los aislados del *agr* grupo III y I son más frecuentes en pacientes colonizados e infecciones superficiales, respectivamente (150).

Por otro lado, en cuanto a la prevalencia y distribución de los distintos alelos o grupos *agr*, se observa una proporción importante de cepas *agr* I obtenidas tanto de pacientes hospitalizados como de individuos portadores sanos (151-153). De forma limitada, se observa también en la bibliografía, la asociación entre linajes específicos de *S. aureus* y

grupos *agr*, como por ejemplo la prevalencia del *agr* I en los complejos clonales (CC) CC8, CC22, CC25, CC45, CC395; *agr* II en CC5, CC12, CC15; *agr* III en CC30 y *agr* IV en CC121 (154).

### **Resistencia a los agentes antimicrobianos**

La presión antibiótica parece favorecer la disminución de la actividad del sistema Agr y eso podría explicar el fallo en la respuesta a ciertas terapias antibióticas observadas en determinadas infecciones causadas por *S. aureus*, como serían la bacteriemia y la endocarditis (131). Existen estudios clínicos que muestran que durante la bacteremia, los aislados con el sistema Agr mutante se asocian a mayor mortalidad y resistencia a los glicopéptidos (145). La reducción de la susceptibilidad a estos antibióticos estaría relacionada con el engrosamiento de la pared celular y una disminución de la actividad autolítica, frecuentemente observada en estos aislados (155).

Estudios recientes han demostrado que las cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a los glicopéptidos (GISA), pertenecientes al *agr* del grupo II eran Agr mutante o disfuncionales (por su incapacidad para producir  $\delta$ -hemolisina) y fuertemente productoras de *biofilm*. Además, aislados de *S. aureus* con resistencia intermedia (VISA) o heterogénea (hVISA) a vancomicina, obtenidos de infecciones persistentes, están comúnmente relacionados con la disfunción del sistema Agr (155) y también a la formación de *biofilm*. Por otro lado, también se ha relacionado la reducción de la susceptibilidad a la vancomicina con cepas de *S. aureus* sensibles a la meticilina (MSSA) Agr mutante o disfuncionales pertenecientes al *agr* grupo II (156).

En cuanto a la relación entre la virulencia y la resistencia a los antibióticos en *S. aureus*, estudios recientes muestran que las concentraciones subinhibitorias de los antibióticos modulan la expresión de los genes de virulencia en un proceso que probablemente involucra el sistema Agr (157-159).

### **Formación de *biofilm***

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el sistema Agr influye en más de una de las etapas de formación de *biofilm* por *S. aureus* (80). En la etapa inicial el aumento en la expresión de moléculas de superficie y adhesión, debido a la inactividad del sistema Agr, favorece el establecimiento de las células planctónicas en las superficies. Sin embargo, en lo que respecta a la etapa de proliferación del *biofilm*, donde la producción de la matriz tiene fundamental importancia, el sistema Agr parece no regular la producción de PIA, ocupándose de esta tarea otro sistema, el QS-*luxS* (80, 160).

A nivel molecular, el sistema Agr actúa de manera complementaria y opuesta al regulador global *sarA*, en la formación de *biofilm*. En estadios iniciales, *sarA* inhibe la expresión de nucleasas y proteasas, a la vez que aumenta la producción de adhesinas,

propiciando así la formación del *biofilm* “inmaduro”. Una vez está estabilizado, la densidad celular de este *biofilm* aumenta evolucionando a un estadio de *biofilm* “maduro”. En este punto, la densidad de AIPs en toda la comunidad bacteriana alcanza el límite de detección por medio del QS e induce la activación del Sistema Agr. Este a su vez, regula de forma positiva la producción de factores de virulencia que dificultan la respuesta inmune y promueven la dispersión de células bacterianas del *biofilm* maduro (81).

De forma general, los productos génicos implicados en la degradación de la matriz que inducen la dispersión de los *biofilms*, y que son regulados por el sistema Agr, incluyen: surfactantes que solubilizan la matriz, DNAsas que afectan a la integridad de la matriz degradando el ADN extracelular y proteasas que descomponen las MSCRAMMs (del inglés, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (83, 160).

### **1.8.2 QS en *P. aeruginosa***

Los sistemas QS de *P. aeruginosa* afectan directa o indirectamente la expresión de más de 300 genes, controlando hasta el 6% de su genoma total (161). *P. aeruginosa* usa una red compleja de receptores y reguladores del QS para controlar la producción de diversos determinantes de virulencia, tales como las proteasas extracelulares, los quelantes de hierro, la expresión de bombas de eflujo, formación de *biofilm*, motilidad y la respuesta hacia el sistema inmune del hospedador (69). Actualmente hay cuatro rutas de QS bien conocidas: dos sistemas mediados por AIs de la familia de N-acil-homoserina-lactonas (AHLs), *las* y *rhl*; el sistema *pqsR* (PQS, del inglés *Pseudomonas quinolone signal*) controlado por una quinolona y el sistema IQS que funciona bajo condiciones limitantes de fosfato (Figura 6) (162).

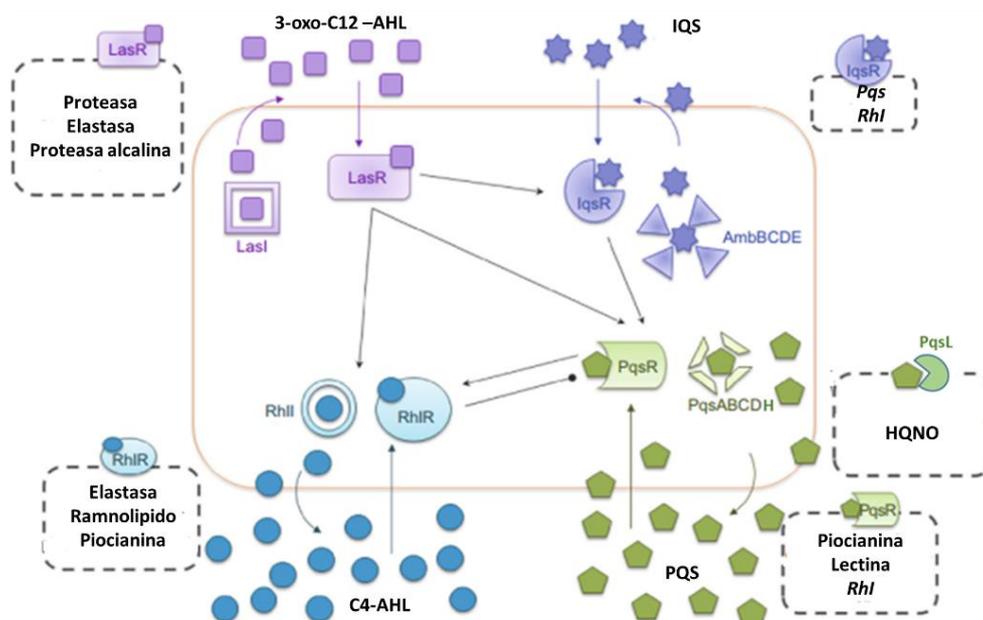
Las AHLs son sintetizadas por miembros de la familia de proteínas de tipo LuxI y son detectadas por miembros de la familia de los reguladores transcripcionales de tipo LuxR. El sistema *las* se basa en la síntesis del gene *lasI* y es reconocido por el regulador de transcripción LasR, que a su vez induce la secreción de N-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3-oxo-C12 -AHL). El *rhl* a su vez, tiene la síntesis controlada por el gene *rhlI*, y su regulador de transcripción es el RhlR, que sintetiza el N-butanoil homoserina lactona (C4-AHL). Juntos, estos dos sistemas inducen la expresión de aproximadamente el 10% del transcriptoma de *P. aeruginosa*. Entre los genes inducidos están los que codifican para el sistema de secreción del tipo III y otros muchos de los factores de virulencia que intervienen en la infección aguda (163).

El sistema *Pqs* participa en la producción de dos tipos de señales basadas en la molécula alquil quinolona (AQ): 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) y su precursor 2-heptil-4-quinolona (HHQ). La molécula PQS, sintetizada a partir de los genes del locus *pqs* (*pqsABCDH*), se une al receptor PqsR y regula el sistema de autoinducción, coordinando

también la expresión y producción de factores de virulencia, especialmente la piocianina y la molécula HQNO (2-heptil-4-hidroxi-quinolona N-óxido) (69, 163, 164).

La biosíntesis de HQNO, a partir de su molécula precursora HHQ, ocurre a través del gen *pqsL* (165, 166) (Figura 6). HQNO es uno de los principales compuestos regulados por el sistema QS-*pqs*. Esta molécula es conocida por inhibir los sistemas de citocromo de algunas bacterias, incluyendo *S. aureus*. Aunque HQNO se describe como un compuesto antiestafilocócico, no tiene actividad lítica contra *S. aureus* en sí, sino que más bien ralentiza el crecimiento al inhibir la respiración oxidativa (164).

Además de las vías de señalización mediadas por AHLs y PQS, se ha propuesto una nueva vía a través de la señal QS recientemente identificada como IQS [2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído], sintetizada por el clúster de genes *ambBCDE*. Sin embargo, algunos estudios sugieren fuertemente que el IQS es un subproducto de la biosíntesis de algunos sideróforos (167).



**Figura 6.** Esquema representativo de las cuatro redes de señalización QS en *P. aeruginosa* y sus respectivos autoinductores. Las cuatro sintetas autoinductoras LasI, RhII, PqsABCDH y AmbBCDE producen los autoinductores 3-oxo-C12-AHL, C4-AHL, PQS (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona) e IQS [2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído], respectivamente. Las moléculas autoinductoras son reconocidas por sus respectivos factores de transcripción citoplásmico LasR, RhIR, PqsR e IqsR, que inducen la expresión de otros genes y/o producción de factores de virulencia, descritos en los recuadros. El gen *pqsL*, perteneciente al locus *PqsABCDH* codifica la molécula HQNO, que es un inhibidor citocromal. Los circuitos individuales están altamente interconectados e implicados en la autoinducción de los demás sistemas. Las flechas indican un efecto estimulante. Modificado de (168).

---

### 1.9 Relaciones interespecies entre *S. aureus* y *P. aeruginosa*

---

Numerosos estudios revelan la diversidad, complejidad y dinámica de las comunidades microbianas durante las ITRI, especialmente en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas. Como se ha descrito previamente, *S. aureus* y *P. aeruginosa* son dos de los patógenos más prevalentes y frecuentes en estas comunidades. A pesar de que la interacción entre ellos tiende a ser competitiva por naturaleza (169), en determinadas situaciones clínicas resulta ser beneficiosa, principalmente en lo que se refiere a la producción de factores de virulencia (164) y formación de *biofilm* (78).

Determinados factores de virulencia producidos por *P. aeruginosa*, y que son regulados por diferentes sistemas QS, parecen tener su expresión estimulada en la presencia de *S. aureus*. Algunos de estos factores extracelulares tienen efecto anti-estafilocócico en condiciones experimentales *in vitro* (164). Por otro lado, en lo que respecta a la interacción entre ellos vía QS, hay indicios de que algunas moléculas AI del QS de *P. aeruginosa* son reconocidas por receptores de la membrana citoplasmática de *S. aureus*, lo que permitiría una influencia directa sobre la virulencia de *S. aureus* en condiciones de co-colonización o coinfección (170).

Las interacciones entre estos dos patógenos, en lo que respecta a la formación de *biofilm* pueden ser antagónicas, como la competencia por nutrientes y la inhibición del crecimiento (171-173). Estas interacciones en la formación de *biofilm* mixto tienen importantes implicaciones clínicas, pues afectan directamente el curso y el tratamiento de las infecciones (82). Sin embargo en ocasiones la interacción puede ser sinérgica, como por ejemplo la cooperación metabólica entre ellos y el desarrollo de fenotipos que contribuyan a una mayor resistencia a los antibióticos o a las respuestas inmunitarias del hospedador (78, 174, 175). Si esta cooperación pudiera estar asociada con los fenotipos de persistencia y adaptación de cada microorganismo a las vías respiratorias, es algo que debe ser investigado aún con mayor profundidad.

## JUSTIFICACIÓN

---

*S. aureus* es un patógeno comensal y oportunista responsable de una amplia gama de infecciones en humanos. Aunque la bacteriemia y las infecciones de piel y tejidos blandos representan las principales formas de manifestación de la enfermedad estafilocócica, las infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI) por *S. aureus* se han convertido en una patología emergente debido al aumento en su frecuencia en el ambiente hospitalario.

Es conocida la dificultad de distinguir entre colonización e ITRI por *S. aureus* tanto en pacientes crónicos como en pacientes sin neumopatía de base. La prevalencia de colonización por este microorganismo dificulta establecer el valor clínico del aislado en muestra respiratoria en determinados grupos de pacientes y establecer la verdadera indicación del tratamiento. Además, la potencial gravedad del desarrollo de neumonía da lugar a frecuente prescripción antibiótica de forma empírica, favoreciendo a su vez el desarrollo de resistencias.

En este contexto, el estudio conjunto de los factores del hospedador (variables clínico-epidemiológicas) y los factores de virulencia que expresa el microorganismo en el nicho ocupado, debería permitir una mejor estratificación de los pacientes, y favorecer de esta manera el diagnóstico y el manejo de las ITRI causadas por este microorganismo.

Por otro lado, el estudio de las interacciones entre *S. aureus* y otros microorganismos aislados en la misma localización anatómica, permitiría ampliar el conocimiento respecto a la importancia de las relaciones interespecies y su impacto sobre la virulencia, persistencia y adaptación al tracto respiratorio, y la progresión o cronicidad de la infección. Como ya hemos visto, *S. aureus* y *P. aeruginosa* frecuentemente coexisten en las comunidades bacterianas que causan infección respiratoria, y si bien las relaciones entre ellos han sido ampliamente estudiadas en cepas aisladas de infecciones pulmonares crónicas, poco se ha investigado respecto a estas interacciones en el contexto de la ITRI aguda. Investigar las interacciones entre estos dos microorganismos podría contribuir a entender la persistencia de *S. aureus* en los procesos de infección pulmonar en pacientes críticos sometidos a ventilación mecánica (VM). Esto también podría desvelar nuevas dianas terapéuticas, principalmente en lo que se refiere a la formación de *biofilm* con implicaciones en la evolución y el tratamiento de las ITRI.

---

## OBJETIVOS

---

El objetivo general de esta tesis doctoral es **determinar la importancia clínica del aislamiento de *S. aureus* en las vías respiratorias inferiores de pacientes sometidos a VM, mediante el estudio de factores asociados con la persistencia y la adaptación del microorganismo a este nicho anatómico.**

Los objetivos específicos son:

**1. Analizar en pacientes sometidos a VM, y con aislamiento de *S. aureus* en muestra respiratoria, factores del hospedador y del microorganismo que tienen un impacto en su persistencia en el tracto respiratorio, así como en la evolución clínica.**

1.1 Estudio de las características clínicas y epidemiológicas en función del grupo de estudio y de la evolución clínica.

1.2 Estudio de características genotípicas de las cepas en función del grupo de estudio y de la evolución clínica.

1.3 Estudio del aislamiento persistente de *S. aureus* en muestra respiratoria: características clínicas y microbiológicas.

**2. Determinar la funcionalidad del sistema Agr en *S. aureus* aislado de muestras de origen respiratorio y evaluar su implicación clínica en las ITRI.**

2.1 Determinación de la funcionalidad del sistema Agr en función de los grupos de estudio.

2.2 Impacto de la funcionalidad del sistema Agr en el aislamiento persistente y el pronóstico clínico.

2.3 Asociación de la funcionalidad del sistema Agr y las características genotípicas y fenotípicas de los aislados clínicos.

2.4 Estudio de la influencia del sistema Agr en la formación de *biofilm*.

**3. Estudiar la interacción entre *S. aureus* y *P. aeruginosa*, aislados de pacientes con sospecha de ITRI, y su influencia en el desarrollo de fenotipos de virulencia y persistencia.**

3.1 Estudio de co-aislados clínicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa*: Caracterización fenotípica y genotípica

3.2 Estudio de la influencia de las relaciones interespecies en el crecimiento planctónico y en la formación de *biofilm* de las cepas co-aisladas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

3.3 Estudio de la estructura de los *biofilms* formados por las cepas co-aisladas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

- 3.4 Estudio de la actividad de los sistemas de *quorum sensing* de *S. aureus* (Agr) y *P. aeruginosa* (PQS)
- 3.5 Estudio de las interacciones entre *S. aureus* y *P. aeruginosa* aislados consecutivamente de pacientes con ITRI en la formación de *biofilm* estático y en flujo continuo.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1 Selección de pacientes y recogida de muestras

---

Se realizó un estudio retrospectivo donde se incluyeron pacientes, en su mayoría ingresados en la UCI de adultos del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP) y sometidos a VM, pero también de otros departamentos como Neumología y Unidad de Cuidados Respiratorios Intermedios (UCRI). Se incluyeron aquellos pacientes que presentaron un aislamiento de *S. aureus* en muestra de origen respiratorio y/o frotis nasal, durante un periodo de dos años (2012-2013) en el contexto de los siguientes proyectos de investigación:

- Infecciones respiratorias graves por *Staphylococcus aureus*: implicación de nuevos factores de virulencia y estudio de las relaciones huésped-microorganismo. SEPAR - Sociedad Española de neumología y cirugía torácica, 2012-2014 (Ref. SEPAR 054/2011).
- Caracterización del ciclo de vida intracelular de *Staphylococcus aureus*. Implicaciones en la evolución y el tratamiento de las infecciones estafilocócicas. Instituto de Salud Carlos III, 2014-2017 (Ref. ISCIII FIS PI13/01418).

De la cohorte de pacientes seleccionados, se realizó un estudio clínico, en el que se revisaron de manera retrospectiva diferentes variables, y un estudio microbiológico y molecular de los aislamientos de *S. aureus* obtenidos. Las muestras respiratorias obtenidas (aspirado traqueal, esputo, líquido pleural o catéter telescópado), así como los hemocultivos se recogieron cuando había sospecha de un cuadro clínico de ITRI. Por otro lado, las muestras de frotis nasal se recogieron en el momento de ingreso en la UCI.

Se recogieron los datos clínicos, en conjunto con el equipo médico de la UCI, de todos los pacientes incluidos en el estudio, desde el día de ingreso hasta el alta de la UCI (traslado a otra unidad de hospitalización o deceso). Se definieron las características epidemiológicas y clínicas de acuerdo con criterios establecidos para este estudio (ver apartado definiciones/ 3.1.1), y los datos registrados incluyeron: edad, sexo, adquisición de la infección, presencia de comorbilidades, motivo de ingreso en la UCI, días de VM, días de estancia en la UCI, compromiso del sistema nervioso central, grado de severidad del paciente en el momento del ingreso incluyendo la escala de coma de Glasgow (GCS) (176) y APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation-II*) (177), desarrollo de complicaciones respiratorias y mortalidad relacionada o no con la infección respiratoria.

Adicionalmente, se recabaron los datos relacionados con el tratamiento antibiótico previo y posterior al resultado positivo del cultivo bacteriológico de la muestra respiratoria. Se documentaron los días de persistencia de *S. aureus* en la muestra respiratoria desde el inicio del tratamiento ajustado al antibiograma, registrando los

días de ventilación mecánica hasta el primer aislamiento de *S. aureus*. Se registró si el primer aislamiento de *S. aureus* fue en cultivo puro o mixto con otro microorganismo y si hubo aislamiento de *P. aeruginosa* en cultivos consecutivos. El modelo de la hoja de recogida de datos utilizada en este estudio se muestra en el anexo 1.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del HUGTiP, y se realizó de acuerdo con los criterios de confidencialidad y disociación de los datos de identificación de los pacientes.

#### **4.1.1 Definiciones**

- Adquisición de la infección: Nosocomial (contraída al menos 48 horas después del ingreso en el centro hospitalario); comunitaria (contraída en el momento de admisión o en un periodo inferior a las 48 horas del ingreso); relacionada con la asistencia sanitaria (178) (contraída al recibir cuidados de salud o durante su estancia en un centro asistencial en los últimos 30 días).

- Complicaciones respiratorias: Empiema, neumotórax, hipoxemia (SpO<sub>2</sub> de 92% o menos, con FiO<sub>2</sub> de 0,22 o SpO<sub>2</sub> de 95% o menos con FiO<sub>2</sub> de 0,5); siendo considerados como complicación respiratoria los casos en que hubo la necesidad de cambios en el soporte de ventilación para mejorar la oxigenación, después de una mejoría inicial, shock séptico (sepsis grave con hipotensión e hipoperfusión tisular) y mortalidad relacionada con el proceso de infección. Las definiciones de estas complicaciones se basan en las descritas en el protocolo de Ferrando C *et al* (179).

- Aislamiento persistente: Inicialmente se consideró como nuevo aislamiento de *S. aureus* en muestras de aspirado traqueal, cuando ocurría en un período de tiempo superior a 72 horas a partir del primer aislamiento, o ese a que el paciente recibiera tratamiento antibiótico ajustado al perfil de susceptibilidad del microorganismo [basado en la definición de bacteriemia persistente con evolución desfavorable (180)]. Posteriormente, para la realización de algunos de los análisis, se consideró el punto de corte en 7 días, basado en el criterio microbiológico para repetir el antibiograma en caso de re-aislamiento durante el tratamiento.

- Portador nasal asintomático: Pacientes con aislamiento de *S. aureus* en frotis nasal (independiente del perfil de resistencia a la meticilina) en ausencia de síntomas respiratorios (36).

Dado que la clasificación entre colonización bronquial e infección no tiene una definición estandarizada, los pacientes con aislamiento de *S. aureus* en muestra respiratoria se clasificaron de acuerdo con los criterios radiológicos y clínicos, incluyendo las puntuaciones de la escala CPIS (44). Por tanto, la población de estudio fue clasificada en diferentes grupos de estudios, definidos como:

- Colonización bronquial: Paciente con aislamiento de *S. aureus* en muestra respiratoria en ausencia de signos clínicos y radiológicos.
- Traqueobronquitis: Paciente que presentó fiebre superior a 38°C sin otra causa de infección reconocida, presencia de secreción purulenta, cultivo microbiológico positivo cuantitativo de la muestra respiratoria y ausencia de signos radiológicos consistentes con el inicio de neumonía (181).
- Neumonía: Paciente con signos clínicos de infección respiratoria, presencia de infiltrado radiológico y puntuación CPIS  $\geq 6$ .

#### 4.2 Procesamiento de las muestras

---

Las muestras respiratorias se procesaron en el laboratorio de Microbiología según procedimiento estandarizado: examen microscópico para establecer la calidad de la muestra (grado de Murray-Washington), tinción de Gram y siembra de las muestras de calidad adecuada en placas de cultivo de agar sangre, chocolate, colistina nalidíxico y McConkey. Para las muestras provenientes de los frotis nasales se realizó la siembra en placas de agar sangre y Chapman.

El procesamiento de los hemocultivos se realizó mediante incubación de los frascos en el sistema automático utilizado en ese momento (BD BACTEC™ blood culture system; Becton Dickinson, EE. UU). Para los hemocultivos positivos se realizó una tinción de Gram, y cuando se observaron cocos con morfología de estafilococo, se determinó la presencia de la coagulasa libre (en tubo) directamente del frasco de hemocultivo, seguido de la lectura posterior a las 4 y 24 horas. A la vez, se realizó la identificación bioquímica y sensibilidad antibiótica directamente del frasco con el Sistema Vitek-2 Compact (Biomérieux, Francia). Además, se realizó la siembra directa en placa de Muller-Hilton agar (MHA) suplementado con sal, con una tira de Epsilon-test (E-test; AB biodisk, Suecia) de cloxacilina y un disco de cefoxitina.

Para todas las colonias de *S. aureus* aisladas a las 18-24h de incubación a 37°C, se realizó la identificación bioquímica convencional mediante una prueba de aglutinación (DiaMondial Staph Plus Latex Kit; DiaMondial, Francia), en la que se detecta la coagulasa fija o *clumping factor*. Para las colonias de *P. aeruginosa* aisladas se realizó la prueba de la oxidasa. Después de los estudios de susceptibilidad antibiótica (ver apartado Caracterización fenotípica/3.5.1) estos aislados fueron congelados en un medio de mantenimiento (Oxoid TP, 15731) a - 80°C hasta que fueron requeridos.

#### 4.3 Cepas de estudio

---

Como se ha descrito anteriormente, para el presente trabajo se utilizó una colección de cepas clínicas obtenidas de cultivos de las muestras respiratorias, hemocultivos y frotis nasales. El conjunto de los aislados clínicos obtenidos a partir de los frotis nasales y hemocultivos fueron utilizados como grupos controles de individuos portadores nasales

asintomáticos y pacientes con infección invasiva, respectivamente. Además, se utilizaron también cepas de referencia para *S. aureus* y *P. aeruginosa* según el estudio y tipo de ensayo que se realizó (Tabla 4).

**Tabla 4.** Cepas bacterianas de referencia utilizadas en esta tesis

Nombre	Características/Comentarios	Referencia o fuente	Ensayo o estudio realizado
<i>S. aureus</i> Newman	Cepa salvaje utilizada ampliamente en modelos de infección animal debido a sus fuertes fenotipos de virulencia.	(182) ATCC 25904	Formación de <i>biofilm</i>
<i>S. aureus</i> RN4220	Cepa productora de $\beta$ -hemolisina derivada de NCTC 8325	(125)	Prueba de CAMP
<i>S. aureus</i> RN6390B	Cepa salvaje que mantiene su patrón hemolítico/ ( <i>Agr</i> <sup>+</sup> )	(183)	VLT
<i>S. aureus</i> RN6911	Cepa derivada de RN6390B con el locus <i>agr</i> reemplazado por una casete <i>tetM</i>	(183)	VLT
<i>S. aureus</i> V8	Leucocidina de <i>Panton Valentine</i> +	(184) ATCC 49775	Formación de <i>biofilm</i>
<i>S. aureus</i> F-182	MRSA SCCmec: Type II	ATCC 433000	Formación de <i>biofilm</i>
<i>S. aureus</i> FPR3757	MRSA USA300	(185) ATCC BAA-1556	Formación de <i>biofilm</i>
<i>S. aureus</i> Seattle 1945	Cepa utilizada ampliamente en pruebas de sensibilidad antibiótica	(186) ATCC 25923	Formación de <i>biofilm</i>
<i>P. aeruginosa</i> MPAO1	Cepa salvaje, AHL positiva	(187)	Formación de <i>biofilm</i>

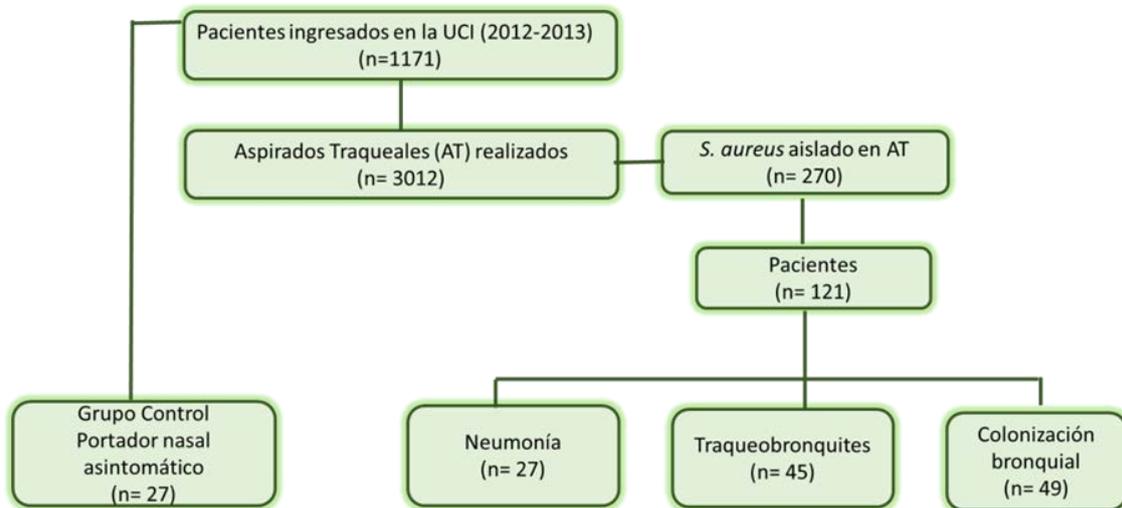
ATCC: American Type Cultures Collection; NCTC: National Collection of Type Cultures; VLT: Vesicle lysis test;

En total se analizaron 153 aislados clínicos de *S. aureus* y siete de *P. aeruginosa*. El origen de las muestras y las cohortes utilizadas para cada uno de los objetivos del estudio, se encuentran desglosados a continuación y representados de forma esquematizada en los siguientes diagramas (Figuras 8 y 9).

**Métodos objetivo 1.** Analizar en pacientes sometidos a VM y con aislamiento de *S. aureus* en muestra respiratoria, factores del hospedador y del microorganismo que tienen un impacto en su persistencia en el tracto respiratorio, así como en la evolución clínica.

Durante el periodo de estudio (2012-2013), un total de 1171 pacientes fueron ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI), y se analizaron 3012 aspirados traqueales (AT). *S. aureus* fue aislado en 270 muestras que correspondieron a los 121 pacientes seleccionados y clasificados en tres grupos de estudio: neumonía,

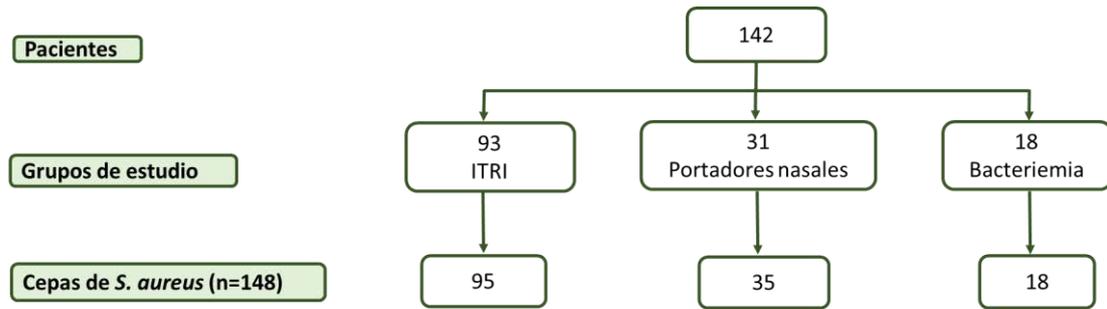
traqueobronquitis y colonización bronquial. Durante este mismo período fueron seleccionados aislados de *S. aureus* proveniente de portadores nasales asintomáticos utilizados como grupo control (Figura 7).



**Figura 7.** Diagrama de flujo de la cohorte de pacientes, muestras respiratorias y aislados clínicos de *S. aureus* analizados en el objetivo 1.

**Métodos objetivo 2.** Determinar la funcionalidad del sistema Agr en *S. aureus* aislado de muestras de origen respiratorio e evaluar su implicación clínica en las infecciones del tracto respiratorio inferior.

Se determinó la funcionalidad del sistema Agr en un total de 148 cepas clínicas, aisladas de 142 pacientes (Figura 8), que fueron clasificadas en tres grupos de estudio según su origen: 95 cepas aisladas de muestras respiratorias (89 aspirados traqueales, cuatro esputos, un líquido pleural y un catéter telescópado protegido) provenientes de 93 pacientes con sospecha clínica de Infección del tracto respiratorio inferior (ITRI) [84 pacientes provenientes de la cohorte analizada en el objetivo 1, y por lo tanto clasificados en colonización bronquial (29), traqueobronquitis (34) y neumonía (21); y nueve pacientes clasificados como otras ITRI provenientes de los servicios de Neumología y de la unidad de cuidados respiratorios intermedios, 35 cepas de muestras de frotis nasales (31 procedentes de portadores asintomáticos, dos obtenidas de pacientes clasificados como colonización bronquial y dos de pacientes clasificados como traqueobronquitis) y 18 cepas aisladas de hemocultivos.



**Figura 8.** Diagrama de flujo de la cohorte de pacientes y aislados clínicos de *S. aureus* analizados en el objetivo 2.

**Métodos objetivo 3.** Estudiar la interacción entre *S. aureus* y *P. aeruginosa*, aislados de pacientes con sospecha de ITRI, y su influencia en el desarrollo de fenotipos de virulencia y persistencia. Para ello, se realizaron dos estudios.

El primer de ellos consistió en analizar cinco pares de cepas formados por ambos microorganismos que fueron aislados simultáneamente (co-aislados) en muestras respiratorias de cinco pacientes ingresados en la UCI con sospecha de ITRI.

El segundo estudio se realizó a partir del análisis de dos casos, formados por aislados clínicos de ambos microorganismos, denominados aquí como casos 1 y 2, donde las cepas seleccionadas fueron aisladas en muestra respiratoria de dos pacientes de la cohorte analizada en el objetivo 1, y que fueron clasificados como traqueobronquitis y neumonía. Para ambos casos el aislamiento de *P. aeruginosa* fue posterior al aislamiento de *S. aureus*.

#### 4.4 Caracterización fenotípica: Resistencia a antibióticos

Los estudios de susceptibilidad antibiótica se realizaron, a menos que se indique lo contrario, mediante el método de difusión en agar (técnica de Kirby-Bauer) siguiendo las normas de interpretación según los criterios establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (188, 189). Los antibióticos evaluados fueron: penicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, cefoxitina, cotrimoxazol (trimetroprím/sulfametoxazol), gentamicina, rifampicina, ciprofloxacino, vancomicina y mupirocina.

En los aislados provenientes de los hemocultivos se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante la tarjeta de sensibilidad AST-588 del Sistema Vitek-2 Compact (Biomerieux, Francia).

Para la detección de la resistencia inducible a clindamicina, se utilizaron discos de eritromicina y de clindamicina colocados en una placa de MHA previamente inoculada con una suspensión bacteriana de turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland, a una distancia de 15-25 mm entre los bordes de ambos discos. Después de 24h de

incubación a 35°C, las zonas de inhibición fueron interpretadas según su tamaño y forma, con el fin de detectar cualquier aplanamiento de la forma en la zona del halo de clindamicina (D-Zona). En estos casos se interpretó la cepa como clindamicina resistente. Para las cepas MRSA determinó la CMI para la mupirocina y la vancomicina mediante E-test (Biomerieux).

#### **4.5 Caracterización genotípica de *S. aureus***

A partir de las cepas de *S. aureus* congeladas a -80°C, se realizó una siembra en placas de agar sangre y tras una incubación durante 18-24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> se realizó la caracterización genotípica de los aislados mediante la tecnología de *microarrays* de DNA en la que se detecta la presencia o ausencia de determinados genes involucrados en resistencia y/o virulencia, y para alguno de ellos detecta además sus variaciones alélicas (190).

Se utilizó el kit comercial *S. aureus genotyping* (Alere Technologies, Alemania) que contiene 334 secuencias diana (aproximadamente 180 genes distintos y sus variantes alélicas). Este kit incluye marcadores de especies, genes que codifican para resistencia a antibióticos, factores de virulencia (exotoxinas, adhesinas, superantígenos, cápsula de polisacárido, proteínas que actúan en la evasión inmune innata), formación de *biofilm*, componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz del hospedador (MSCRAMM) y también detecta los diferentes alelos *agr*. Por otro lado, con base al perfil de genes presentes o ausentes, la técnica también permite inferir el genotipo al que pertenece el aislado basado en la técnica de tipificación de secuencias multilocus (MLST, del inglés *Multilocus Sequence Typing*)(191).

El protocolo de la técnica consiste en 4 etapas que se describen a continuación y que fueron realizadas básicamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

##### Etapa 1. Extracción del DNA

En primer lugar, se realizó un pretratamiento de las colonias, utilizando el tampón de lisis del propio kit. Para ello se reconstituyó un liofilizado (tubo *ependorf* A2) proporcionado por el kit, y una vez obtenida esta solución se añadió toda la biomasa recogida en un asa de 10 µL de la cepa crecida en agar sangre y se incubó esta mezcla durante 60 min a 37 °C en agitación (550 rpm). Realizado este procedimiento, se siguió el protocolo de extracción del manual *DNAeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, EE. UU), y se cuantificó el DNA extraído mediante el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer, EE.UU.).

### Etapa 2. Amplificación del DNA

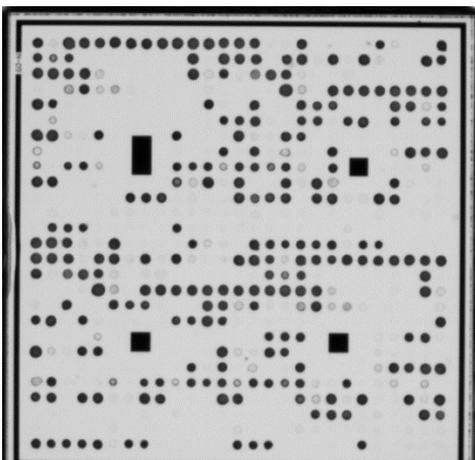
La reacción de amplificación del DNA, mediante una PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) lineal marcada con biotina-dUTP, se llevó a cabo en el termociclador Veriti (Applied Biosystems, EE. UU) usando los reactivos del kit. Para cada reacción de PCR se preparó una mezcla de 4,9  $\mu\text{L}$  del reactivo B1 y 0,1  $\mu\text{L}$  del reactivo B2 (Enzima), y se añadieron 5  $\mu\text{L}$  (0.5-2  $\mu\text{g}$ ) del DNA extraído de cada cepa, para un volumen final de 10 $\mu\text{L}$ . Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 5 min para la desnaturalización inicial a 96°C, seguido de 45 ciclos de 20 segundos a 96°C, 20 segundos a 50°C, 30 segundos a 72°C, y una última fase de enfriamiento a 4°C.

### Etapa 3. Hibridación del DNA

El producto de PCR una vez amplificado, se transfiere a la membrana del *microarray* donde se unirá a las sondas específicas. En esta etapa se prepararon las muestras, que fueron posteriormente transferidas a los pocillos donde se encuentra la matriz del *microarray*. Una vez transcurrido el tiempo de hibridación, se procedió a la detección del producto amplificado biotinilado que se unió a las sondas a través del conjugado de estreptavidina peroxidasa. La actividad de la peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble que precipita en las zonas del *microarray* donde se había producido la hibridación (Figura 10).

### Etapa 4. Análisis de los datos e inferencia del Complejo Clonal

La lectura e interpretación de los resultados se realizó mediante el equipo Array Mate (Alere, Alemania), que detecta y cuantifica la luz emitida por el precipitado formado a partir de la hibridación entre el DNA y la sonda específica. Como consecuencia, se genera una imagen de la membrana del *microarray* que fue analizada por un *software* específico proporcionado por la empresa Clondiag GmbH (Jena, Alemania) (Figura 9).



**Figura 9.** Membrana del *microarray* *S. aureus* genotyping. Ejemplo del resultado obtenido después de la lectura e interpretación de los datos. Los puntos negros representan la hibridación del DNA amplificado con las respectivas sondas.

Los resultados obtenidos corresponden a un informe descriptivo que indica la presencia o ausencia de cada uno de los genes analizados. Además, también se ha asignado a cada aislado de *S. aureus* una secuencia tipo (ST) y/o CC mediante el análisis comparativo del resultado obtenido con el perfil de una colección de cepas de referencia previamente caracterizadas y disponibles en la base de datos Array Mate (191).

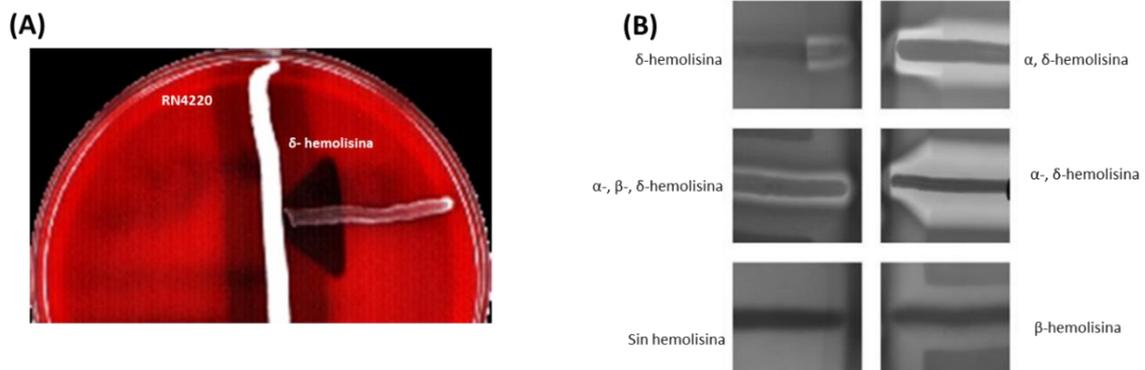
#### 4.6 Determinación de la funcionalidad del Sistema Agr

Para estudiar la funcionalidad del Sistema Agr se emplearon tres métodos diferentes: la prueba de CAMP (Test de Christie, Atkins y Muench-Petersen), el test de lisis de vesículas (VLT) y una PCR cuantitativa con transcripción reversa (qRT-PCR) para el gen *rnall*.

##### 4.6.1 Prueba de CAMP

Este es un método fenotípico cualitativo convencional que determina la funcionalidad del operón *agr* a través de la producción de  $\delta$ -hemolisina(192). El test consistió en confrontar perpendicularmente una estría de la cepa de interés con una estría de una cepa de *S. aureus* productora de  $\beta$ -hemolisina (*S. aureus* RN4220) en una placa de agar sangre. Tras una incubación durante 18-24h a 37°C, seguida de otra durante el mismo tiempo a 4°C (hemólisis “calor-frío”), se puede observar la presencia o ausencia de una reacción hemolítica cooperativa entre las dos hemolisinas producidas ( $\delta$  y  $\beta$ ) en forma de “flecha” (Figura 10A). Se realizaron fotografías de las placas para ser analizadas posteriormente, y mediante el consenso de tres observadores diferentes y de acuerdo con criterios establecidos previamente (193) (Figura 10B), se asignó la funcionalidad del operón *agr* como positiva o negativa, según la presencia o ausencia de este patrón de hemólisis sinérgica, respectivamente.

Este ensayo por lo general permite identificar la actividad de las tres hemolisinas estafilocócicas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ -hemolisina) debido las interacciones entre ellas:  $\beta$ -hemolisina mejora la lisis por  $\delta$ -hemolisina, a la vez que inhibe la lisis por  $\alpha$ -hemolisina (194) (Figura 10B).



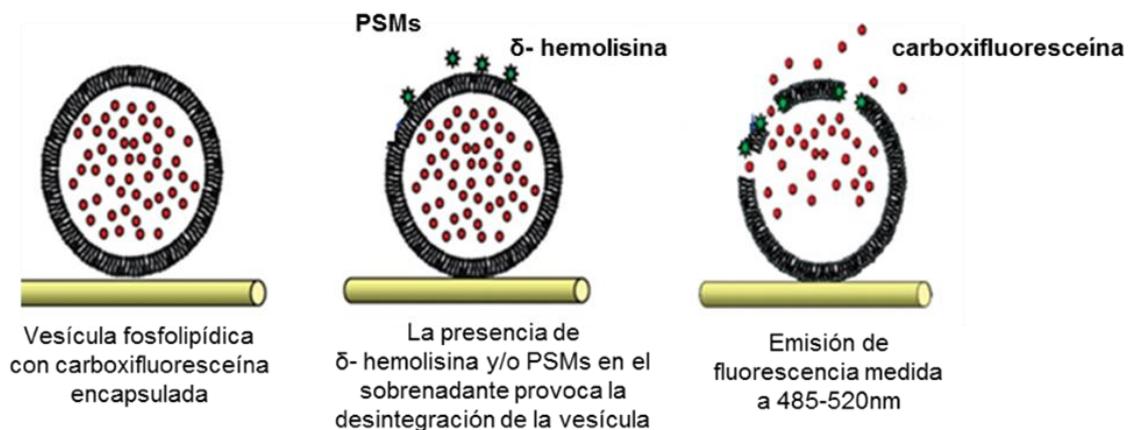
**Figura 10.** Ejemplo de resultados de la prueba de CAMP y de la actividad hemolítica en agar sangre. (A) Cepa de *S. aureus* productora de  $\delta$ -hemolisina sembrada perpendicularmente a la cepa RN4220 de *S. aureus* productora de  $\beta$ -hemolisina. Se observa el patrón de hemólisis en forma de “flecha” debido a la

sinergia entre  $\beta$  y  $\delta$ -hemolisina, indicativo de un sistema Agr funcional. (B) Actividad hemolítica frente a *S. aureus* RN4220 que muestra la actividad de las tres hemolisinas estafilocócicas. Modificado de (193).

#### 4.6.2 Test de lisis de vesículas (VLT)

Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Departamento de Biología y Bioquímica de la Universidad de Bath; Reino Unido, durante una estancia pre-doctoral. La prueba se basa en un ensayo descrito recientemente (195), donde la presencia de  $\delta$ -hemolisina y/o PSMs en el sobrenadante del cultivo analizado provoca la ruptura de unas vesículas sintéticas, de composición similar a las membranas plasmáticas eucariotas, que llevan incorporadas un fluoróforo, y que al ser liberado genera una señal indicando la actividad del sistema Agr (Figura 11).

Se realizó la siembra de los aislados clínicos en placas de TSA, y se incubaron durante 18/24h a 37°C. Se prepararon cultivos bacterianos a partir de una única colonia de cada cepa, por triplicado, en 5 mL de TSB durante 18 h de incubación a 37°C y 180 rpm. Se recogió 1 mL de cada cultivo y se centrifugó durante 10 min a 14000 g. Se recuperaron 500  $\mu$ L de cada sobrenadante y se almacenaron a -20°C. Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas en el equipo Christ Alpha 1-4 (B. Braun Biotech, Alemania) y transportadas a la Universidad de Bath (Reino Unido) donde fueron procesadas.



**Figura 11.** Principio del test de vesículas (VLT). PSMs; *Phenol Soluble Modulins*. La presencia de  $\delta$ -hemolisina y/o PSMs en el sobrenadante del cultivo de la cepa analizada, provoca la lisis de unas vesículas sintéticas, de composición fosfolipídica, que llevan carboxifluoresceína encapsulada. La liberación del fluoróforo genera una señal de fluorescencia que indica la funcionalidad del sistema Agr. Modificado de (196).

La preparación de la solución de vesículas se realizó según se ha descrito previamente (195). De forma resumida, la solución de vesículas consiste en una mezcla de lípidos y ácidos grasos disueltos en cloroformo, que son congelados en nitrógeno líquido y

después rehidratados con una solución de carboxifluoresceína (CF). Una vez la CF está encapsulada dentro de las vesículas, la solución es homogenizada utilizando el equipo Liposofast *vesicle extruder* y purificada por el sistema de columnas ilustra Nap-25 *columns* (GE Healthcare, EE. UU), que elimina la CF no encapsulada.

Una vez preparadas las vesículas se procedió propiamente a la realización del ensayo VLT. Los sobrenadantes liofilizados fueron resuspendidos en 500  $\mu$ L de agua ultra pura y una alícuota de 50  $\mu$ L de la suspensión fue mezclada con 50  $\mu$ L de la solución de vesículas en una placa de 96 pocillos de poliestireno. Los controles positivo y negativo fueron la solución de vesículas pura con 0.01% de Triton X-100 y HEPES, respectivamente. La intensidad de fluorescencia de cada muestra se midió durante 30 min a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 a 520 nm, respectivamente, en un fluorímetro Fluorostar (BMG Labtech, Reino Unido). La fluorescencia normalizada se obtuvo utilizando la ecuación  $(F_t - F_0) / (F_m - F_0)$ , donde  $F_t$  es el valor medio de fluorescencia en un punto de tiempo específico,  $F_0$  es el mínimo y  $F_m$  es el valor máximo de fluorescencia emitida en ese experimento (195).

#### **4.7 Transcripción reversa y PCR cuantitativa para el gen *rnalIII* de *S. aureus***

Este ensayo se realizó también en colaboración con el Departamento de Biología y Bioquímica de la Universidad de Bath (197). De forma resumida, se prepararon cultivos en 5 mL de TSB durante 18h a 37°C /180 rpm para cada una de las cepas analizadas. Se realizó una dilución 1:1000 en TSB que se incubó durante 8h a 37°C. Los cultivos se normalizaron según las mediciones de  $DO_{600nm}$  antes del aislamiento del RNA. Dos volúmenes de RNAProtect (Qiagen, EE.UU.) fueron añadidos a un volumen de cada cultivo y se realizó una incubación a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 g y el sedimento fue resuspendido en tampón Tris-EDTA (Ambion, EE.UU.) con lisostafina (Cell Sciences, Canadá) a una concentración de 200  $\mu$ g/mL. Tras una incubación de 60 min, seguido de un tratamiento con proteínasa K durante 30 min, se procedió a la extracción del RNA. Se aisló el RNA usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante, con la adición de *DNase* turbo (Ambion, EE.UU.) después de la etapa de purificación. El RNA fue cuantificado utilizando el kit de Qubit RNA BR (ThermoFisher Scientific, EE.UU.). La ausencia de DNA se verificó mediante PCR.

La transcripción reversa se realizó usando el sistema de transcripción inversa QuantiTect (Qiagen, EE.UU.). Las curvas de calibración se generaron para el gen *rnalIII*, con los cebadores [*rnalIII*FW: 5'-GAAGGAGTGATTTCATGGCACAAG-3'; *rnalIII*RV:5'-GAAAGTAATTAATTATTCATCTTATTTTTAGTGAATTTG-3'] y luego se utilizó el gen de la girasa B con los cebadores [*gyr*FW:5'-CCAGGTAAATTAGCCGATTGC-3'; y *gyr*RV:5'-AAATCGCCTGCGTTCTAGAG-3'] para normalizar y obtener la expresión relativa respecto a un gen constitutivo.

Para la reacción de qPCR se utilizó el kit SYBR *green* PCR *master mix* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y la detección cuantitativa se hizo mediante el equipo Step-One *Real Time* PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min, seguido de una etapa de disociación de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

El ciclo umbral (Ct) fue determinado a partir de los valores obtenidos de la curva estándar de dos replicas biológicas, y la expresión relativa fue normalizada respecto al valor de la cepa control positivo (RN6390). Los aislamientos cuyos niveles de expresión resultaron 10 veces menores que el valor del control positivo, tras la obtención de las muestra a las 8h, fueron considerados como Agr disfuncional, de acuerdo con los hallazgos previos que determinan la expresión tardía del gen *rnaIII* y la disfunción de Agr (192, 193).

#### **4.8 Optimización de las condiciones de cultivo**

---

Los medios de cultivo microbiológico utilizados en este trabajo y su preparación se describen en el anexo 2. Diferentes condiciones de cultivo fueron testadas previamente, utilizando las cepas de referencia de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, con el fin de optimizar el estudio desarrollado en el objetivo 3. Entre los medios de cultivo analizados se seleccionó el TSB 0,5X suplementado con 1% de glucosa, debido a los buenos resultados observados en cuanto a la formación de *biofilm* por ambas especies (Anexo 3). Además, se utilizó el medio ASM, para intentar reproducir *in vitro* la mucosidad del tracto respiratorio, ya que este medio artificial contiene mucina y simula el esputo. En este caso, se utilizó una mezcla entre este y el TSB 0,5X suplementado con 1% de glucosa en igual proporción (1:1).

#### **4.9 Curvas de crecimiento bacteriano**

---

Se determinaron las curvas de crecimiento para el conjunto de cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* que fueron analizadas en el objetivo 3 (apartado 4.3). Se realizaron cultivos bacterianos para cada una de las especies, a partir de una única colonia de cada cepa, en 10 mL de medio LB durante 18h a 37°C/ 180 rpm. Estos cultivos fueron utilizados para iniciar las curvas de crecimiento bacteriano, donde partiendo de una DO<sub>550nm</sub> de 0,05, se prepararon cultivos frescos puros para cada una de las especies, y mixtos entre los co-aislados, en 20mL de TSB 0,5X glucosa 1%. Posteriormente, con las mismas condiciones de cultivo (37°C /180 rpm) se monitorizó el crecimiento bacteriano mediante el seguimiento de la DO<sub>550nm</sub> y el recuento de ufc/mL en placas de crecimiento selectivo para *S. aureus* (agar manitol salado, CONDA) y *P. aeruginosa* (agar *MacConkey* sorbitol, Difco™). Estas mediciones se realizaron cada hora hasta totalizar entre 9 y 10h. Cada curva de crecimiento se hizo por duplicado y se graficaron las medias aritméticas de las mediciones en cada punto de tiempo con sus desviaciones estándar.

Además, se determinó el recuento de ufc/mL para ambas especies, a las 24h de cultivo mixto, realizado en una mezcla de los medios de cultivo ASM y TSB 0,5X glucosa 1% (1:1), partiendo de una  $DO_{550nm}$  de 0,1 para las cepas de *S. aureus* y 0,01 para las cepas de *P. aeruginosa*, utilizando las mismas condiciones de cultivo (37°C /180 rpm).

#### 4.10 Ensayos de formación de *biofilm*

##### 4.10.1 Formación de *biofilm* en placas de microdilución

La producción de *biofilm* se determinó mediante tinción con cristal violeta (CV) según se ha descrito previamente (198, 199), con las modificaciones que se mencionan a continuación. Se usaron placas de microdilución de 96 pocillos, de poliestireno, estéril, no tratadas y de fondo plano (BRANDplates® 781662, Alemania). Se realizaron precultivos bacterianos para cada una de las cepas, a partir de una única colonia, en 10 mL de medio LB durante 18h a 37°C/ 180 rpm. Se ajustó la suspensión bacteriana en el medio de cultivo fresco (TSB 0.5X glucosa 1%; ASM<sup>+</sup> o la mezcla de los dos en la proporción 1:1) a una  $DO_{550nm}$  de 0,01 y 0,05 para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente. Se inoculó 200  $\mu$ L del cultivo ajustado en cada pocillo (12 réplicas por aislamiento o condición). Posteriormente las placas se incubaron durante 24h a 37°C. Antes de realizar la tinción con CV se determinó la  $DO_{600nm}$  de los cultivos en cada uno de los pocillos, para así normalizar posteriormente la producción de *biofilm* con respecto al crecimiento de cada cepa. Se descartó el sobrenadante y se lavó la placa tres veces con agua destilada. Las placas se incubaron durante 60 min a 60°C para fijar el *biofilm* y posteriormente se procedió a la tinción de cada pocillo con 200  $\mu$ L de CV 0,1% (p/v) durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de CV, se realizaron tres lavados de la placa con agua destilada y se secaron a 37°C. Para disolver el CV adherido al *biofilm*, se añadió 250  $\mu$ L de ácido acético glacial 30% (p/v) y se incubó durante 15 min. Posteriormente se transfirió 150  $\mu$ L de la mezcla ácido acético y CV homogeneizado a otra placa de microdilución y se determinó la absorbancia a una  $DO_{550nm}$  en un lector de placas (Wallac Victor, Perkin Elmer, EE. UU.). Para este ensayo, la formación de *biofilm* se definió como *biofilm* relativo, y se calculó según la fórmula siguiente:  $DO_{550nm} CV / DO_{600nm} \text{ cultivo}$ .

Para un determinado conjunto de aislados clínicos de *S. aureus*, la formación de *biofilm* relativo, fue clasificada en débil, moderada o fuerte, tomando como referencia la cepa de *S. aureus* Agr funcional (RN6390B). Se utilizó un valor de corte igual a 0,68 (valor de formación de *biofilm* relativo  $\leq 2x$  *biofilm* relativo formado por la cepa RN6390B), usando el medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%. Los aislamientos con valores de formación de *biofilm* relativo  $\leq 0,68$  fueron considerados como *biofilm* débil, con valores  $\geq 0.7 \leq 2$  como *biofilm* moderado y, por último, valores de *biofilm* relativo  $> 2$  considerados como *biofilm* fuerte.

Para los *biofilms* formados en la mezcla 1:1 de los medios de cultivo ASM y TSB 0,5X glucosa 1%, el valor de corte fue de 0,86. Los aislamientos con valores de formación de

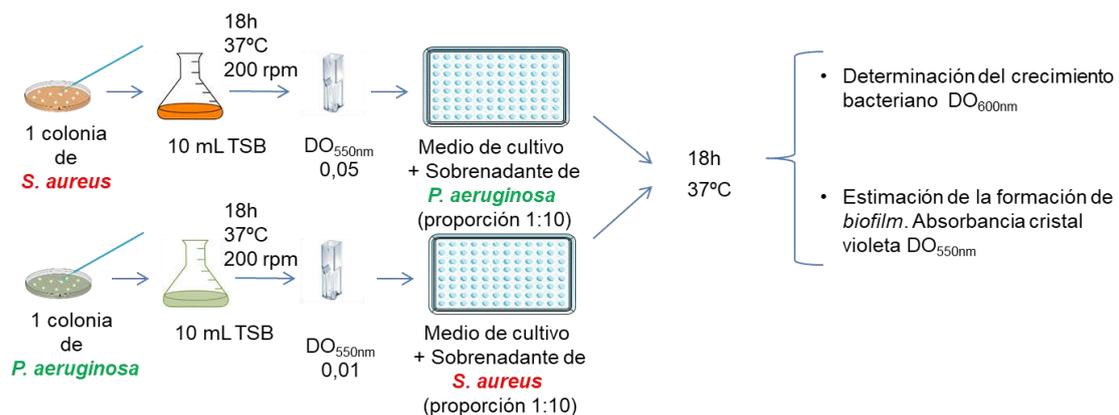
*biofilm* relativo  $\leq 0,86$  fueron considerados como *biofilm* débil, con valores  $\geq 0,8 \leq 2$  como *biofilm* moderado y valores  $> 2$  fuerte como *biofilm* fuerte.

#### 4.10.2 Ensayo de formación de *biofilm* cruzado

En este trabajo, se denomina “ensayo de *biofilm* cruzado”, a una modificación del protocolo mencionado en el apartado anterior, que consiste en evaluar la formación de *biofilm* por parte de una especie en presencia del sobrenadante de cultivo bacteriano de otra especie.

Inicialmente se procedió a la preparación de los sobrenadantes, donde se realizó el cultivo de una colonia de cada aislado clínico en 100 mL de TSB 0,5X glucosa 1% durante 18h a 37°C/200 rpm. Tras la incubación, los cultivos fueron centrifugados durante 20 min a 4°C/14000 rpm y decantados con cuidado para obtener los sobrenadantes libres de células. Posteriormente se esterilizaron todos los sobrenadantes bacterianos mediante filtración con un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Merk Millipore, EE. UU) y se almacenaron a -20°C, hasta su utilización. Antes de la realización del ensayo de *biofilm* cruzado, se suplementaron los sobrenadantes añadiendo 5mL de glucosa 4% (p/v) a una alícuota de 45 mL de cada sobrenadante, y se ajustó el pH a 7. Además, se agitaron los frascos que contenían la alícuota del sobrenadante para garantizar su oxigenación.

Para el ensayo de *biofilm* cruzado, se utilizó como medio de cultivo una mezcla de 1:10 del sobrenadante seleccionado en TSB 0,5X glucosa 1% (Figura 12). Esta proporción de sobrenadante fue seleccionada después de un ensayo piloto de optimización.



**Figura 12.** Metodología utilizada para el ensayo de formación de *biofilm* cruzado.

Se realizaron precultivos, a partir de una colonia de cada cepa clínica de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, en 10 mL de TSB durante 18h a 37°C/ 180rpm, y se ajustó la suspensión bacteriana a una  $DO_{550nm}$  de 0,05 y 0,01, respectivamente en el medio de cultivo con el sobrenadante de la otra especie. Se inocularon los pocillos con 200  $\mu\text{L}$  de esta suspensión bacteriana ajustada y después de una incubación de 18h a 37°C se realizaron

las medidas de absorbancia correspondientes al crecimiento bacteriano y a la tinción del CV, de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 4.10.1.

#### **4.10.3 Estudio de la morfología del *biofilm* en cultivo estático**

Para estudiar la morfología o arquitectura del *biofilm* se procedió a la formación de *biofilm* estático en placas de cultivo estériles, especiales para microscopía, con fondo de plástico y superficie hidrofílica ( $\mu$ -Dish ibidi®81156, Alemania). Un día antes de realizar este ensayo, se inocularon precultivos de 10 mL de LB con una colonia de cada cepa, que se incubaron durante 24h a 37°C/180rpm.

Se estudió la formación de *biofilm* simple (con un único microorganismo) y mixto (con los dos microorganismos) utilizando los medios de cultivo TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% y la mezcla 1:1 entre él y el ASM. Para la formación de *biofilm* simple se preparó, a partir de los precultivos una suspensión bacteriana ajustada a una  $DO_{550nm}$  de 0,01 para *P. aeruginosa* y 0,05 para *S. aureus* en 2 mL del medio de cultivo seleccionado. Por otro lado, después de algunos ensayos de optimización, para la formación de *biofilm* mixto, se ajustó la suspensión bacteriana a una  $DO_{550nm}$  de 0,01 para *P. aeruginosa* y de 0,1 para *S. aureus*.

Se inoculó 1 mL de cada suspensión bacteriana ajustada en las placas de cultivo para microscopía. Después de 24h de incubación a 37°C sin agitación, se descartó el cultivo bacteriano y se realizaron dos lavados con agua destilada. Posteriormente, las placas de cultivo se secaron a temperatura ambiente. Antes de proceder a la tinción de las muestras de *biofilm*, se realizó una fijación con 1 mL de paraformaldeído a 4% (p/v) durante 15 min, seguido de dos lavados con agua destilada.

Para teñir las muestras se utilizó el kit ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain and Viability (V-7023; Molecular Probes, EE. UU), que permite el marcaje diferencial entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se preparó una dilución para cada uno de los fluorocromos utilizados en 1 mL de PBS: 2  $\mu$ L para *SYTOX Green* y 20  $\mu$ L para *Texas Red-X conjugate of wheat germ agglutinin* (WGA). Se añadieron 200  $\mu$ L de cada fluorocromo diluido a cada una de las muestras y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalizada la incubación, se realizó un lavado con PBS. Posteriormente, se añadió una gota de medio de montaje y un cubreobjeto a cada una de las muestras, y se analizó mediante microscopía de barrido láser confocal.

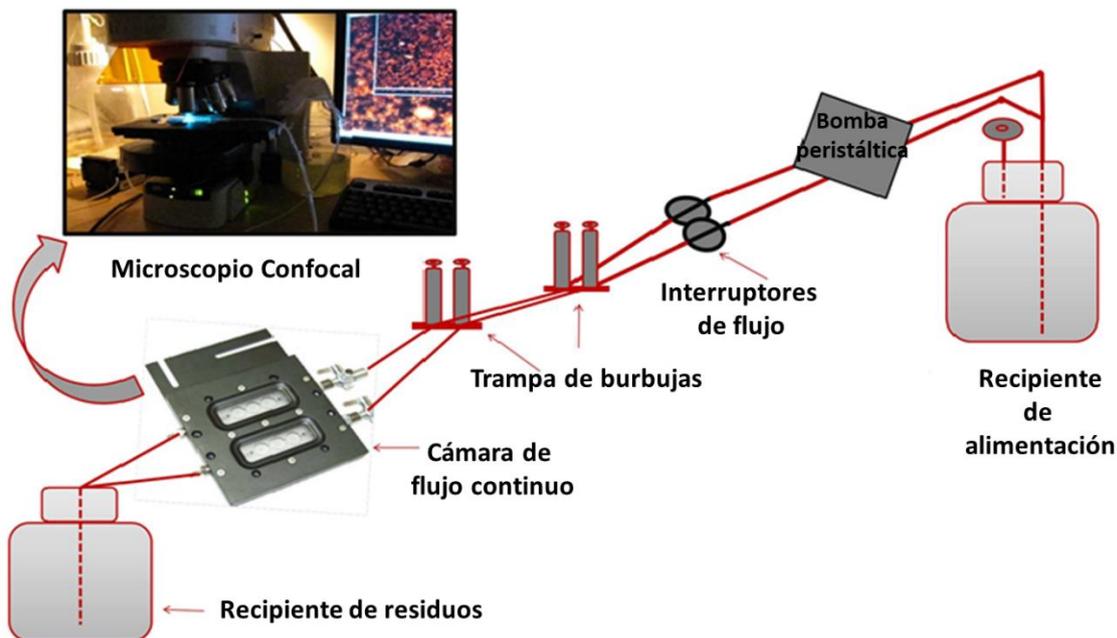
El análisis morfológico de los *biofilms* en cultivo estático se realizó en el Servicio de Microscopía de la UAB con el microscopio confocal espectral Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania) de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes. Se utilizó un objetivo Plan Apocromático de 63x (1.4 NA), y dos canales para captar la intensidad de la señal de los dos fluorocromos: canal verde (500-550 nm) para observar el marcaje de *P. aeruginosa* con *SYTOX Green*, y canal rojo (600-779 nm) para observar el marcaje de *S. aureus* con *Texas Red-X WGA*. El

número de secciones captadas fue variable en función de cada muestra. La distancia entre sección y sección fue de  $0.17\mu\text{m}$ . Las imágenes se adquirieron en formatos de  $1024 \times 1024$  pixels y fueron procesadas con el programa informático Imaris version 6.1 (Bitplane AG Zurich, Suiza) y el propio de Leica (Las AF, version 2.5).

#### 4.10.4 Ensayos de *biofilm* en flujo dinámico

Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Departamento de Química de la Universidad de Umea (Suecia) durante una estancia pre-doctoral. Se analizaron, mediante este ensayo, los dos casos de aislados clínicos 1 y 2, formados por las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* aisladas consecutivamente descritas en el objetivo 3 (apartado 4.3), que representan la condición de aislamiento de *S. aureus* seguido del aislamiento de *P. aeruginosa*.

Inicialmente se ensambló, preparó y esterilizó el sistema de cámaras de flujo continuo según la bibliografía existente (200, 201). El sistema, formado por los tubos y los conectores, se preparó de manera que el medio de cultivo TSB 0,5X glucosa 1%, diluido 10 veces, fluyera con la ayuda de la bomba peristáltica, desde el recipiente de alimentación hacia el recipiente de residuos, pasando por las trampas de burbujas y por la cámara de flujo (Figura 13).



**Figura 13.** Sistema de flujo continuo y visualización del *biofilm* a través de microscopía confocal.

Los ensayos se realizaron según se ha descrito previamente (201) con las modificaciones que se mencionan a continuación. Se realizaron precultivos, a partir de una colonia de cada cepa clínica de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, en 10 mL de medio ISO-SENSITEST (Oxoid) durante 24h a  $37^{\circ}\text{C}$  /180 rpm. Se realizó una resiembra 1:100 de este cultivo en 10 mL de ISO-SENSITEST, y se incubó durante 3h en las mismas condiciones. Se recogió 2 mL de

cada cultivo y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 0,5mL de NaCl 0,9%. A partir de este concentrado bacteriano se preparó una suspensión bacteriana en 3 mL de NaCl 0,9%, ajustada a una  $DO_{600nm}$  de 0,01 para *P. aeruginosa* y 0,1 para *S. aureus*.

Para la formación de *biofilm* simple se inocularon, mediante una jeringuilla, 2 mL de la suspensión bacteriana ajustada en cada uno de los canales de la cámara de flujo. Se invirtió la cámara y se interrumpió el flujo laminar durante 30 min para favorecer la adherencia inicial de las células a la superficie. Transcurrido este tiempo, se puso el sistema en la posición normal, y se restableció el flujo a una velocidad constante de 0,7 mL/min que permitió el paso del medio TSB 0,5X glucosa 1% diluido 10X por cada canal de la cámara, debido a la acción de la bomba peristáltica (Watson-Marlow, Suecia). Se incubaron los *biofilms* durante 48h en una cámara a 37°C.

En los ensayos de formación de *biofilm* mixto, primero se procedió a la inoculación de la suspensión bacteriana de *S. aureus*, seguido del periodo de adherencia inicial y del funcionamiento del sistema durante 2 horas. Pasado este tiempo, se interrumpió el flujo y se añadió el inóculo de *P. aeruginosa*, también seguido de los 30 min de adherencia inicial a la superficie. Transcurrido este periodo, el sistema volvió a fluir a 0,7 mL/min durante 48h en la cámara a 37°C.

Finalizada las 48h de incubación, las muestras se tiñeron utilizando los fluorocromos descritos en el apartado 4.10.3, y se analizaron mediante microscopía de barrido láser confocal. Para realizar la tinción se preparó una dilución de los fluorocromos en 2 mL de NaCl 0,9%: 2  $\mu$ L para *SYTOX Green* y 40  $\mu$ L para *Texas Red-XWGA*. Se interrumpió el flujo del sistema y se añadió 1 mL de esta solución en cada uno de los canales de la cámara de flujo. Los experimentos se realizaron por duplicado y se capturaron distintas imágenes para cada canal.

Para el análisis de los *biofilms* formados en la cámara de flujo continuo se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse90i equipado con un sistema de emisión láser de tres canales, Nikon D-eclipse C1 (Nikon Corporation, Japón). La captación de la intensidad de la señal y el procesamiento de las imágenes fueron ejecutados por los programas Nikon EZ-C1 (versión 3.80) y NIS-Elements Advanced Research (versión 3.2), respectivamente (Nikon Corporation, Japón).

#### **4.11 Bioensayo para detectar AHLs mediante cepa biosensora**

La producción de AHLs por parte de las cepas de *P. aeruginosa* co- aisladas con cepas de *S. aureus*, fue determinada mediante el uso de un biosensor AHL, que se inocula embebido en placas de BM2 agar/ X-gal a modo de un agar de doble capa. Este biosensor AHL está basado en el QS Tral/R, y consiste en un sistema de tres plásmidos (pJZ384) (pJZ410) (pJZ372) incorporados en la cepa *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 (202). El plásmido pJZ384 contiene el gen *traR* bajo el control del promotor del fago T7,

pJZ410 contiene el gen de la RNA polimerasa del fago y el pJZ372 contiene la fusión *tral-lacZ*. La presencia de AHL exógenas activa la expresión del promotor *tral*, que a su vez induce *lacZ*. La reacción de hidrólisis del compuesto X-gal presente en el medio donde se realiza el bioensayo, debido a la acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, genera la aparición de un halo azul que es fácilmente visualizado (203).

Para preparar 50 mL del medio BM2 agar/X-gal conteniendo *A. tumefaciens*, inicialmente se preparó un cultivo durante 18h de la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55 en 20 mL de medio BM2 a 30°C/190 rpm. Se añadieron los antibióticos espectinomocina (100  $\mu$ g/mL), tetraciclina (2  $\mu$ g/mL) y gentamicina (100  $\mu$ g/mL) para el mantenimiento de los tres plásmidos que permiten la detección de las AHLs exógenas (pJZ384, pJZ410 y pJZ372). Tras el periodo de incubación, el cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min a 4°C y se resuspendió el sedimento en 10 mL de medio BM2. Se mezclaron los 10 mL del cultivo resuspendido con 20 mL de medio BM2 estéril, 20 mL de agar noble (Difco™) al 2 % y la solución de X-gal a una concentración final de 40  $\mu$ g/mL. Se dispensó 15 mL del medio en las placas de petri de 55 mm y se dejaron solidificar.

Se prepararon precultivos en 10 mL de LB durante 18h a 37°C/190 rpm para cada una de las cepas de *P. aeruginosa* analizadas. Se realizó una resiembra a una  $DO_{550nm}$  de 1,0 en el medio decultivo fresco, y se inocularon 2  $\mu$ L en las placas del bioensayo (tres réplicas por aislamiento). Las placas se incubaron durante 18h a 30°C y se escanearon utilizando el escáner Epson perfection V50000 photo con el programa Epson Scan v.3.74ES.

#### **4.12 Transcripción reversa y PCR cuantitativa para el gen *rnalIII* de *S. aureus* en presencia del sobrenadante de *P. aeruginosa*.**

Se realizaron precultivos en 10 mL de TSB durante 18h a 37°C/180 rpm, para cada una de las cinco cepas co-aisladas de *S. aureus*, descritas en el apartado cepas de estudio/4.3. Se realizó una resiembra 1:1000 en una mezcla de 1:100 del sobrenadante de *P. aeruginosa* seleccionado en TSB 0,5X glucosa 1%, y se incubó durante 8h a 37°C/180 rpm. Los cultivos fueron normalizados antes de la extracción de RNA a una  $DO_{600nm}$  igual a 2. Se añadieron dos volúmenes de RNAprotect (Qiagen, EE.UU.) a cada cultivo normalizado y se incubó durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 3000 g y el sedimento se resuspendió en tampón Tris-EDTA (Sigma-Aldrich, EE.UU.) con lisostafina (AMBI products, EE.UU.) a una concentración de 200  $\mu$ g/mL. Tras una incubación de 60 min, seguido de un tratamiento con proteinasa K durante 30 min, se procedió a la extracción del RNA. Se aisló el RNA usando RNeasy Mini (Qiagen, EE.UU.). El RNA fue cuantificado a través del equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer, EE.UU.). La ausencia de DNA y la especificidad de los cebadores se verificó mediante PCR.

La transcripción reversa se realizó usando el sistema de transcripción inversa First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fischer, EE.UU.). Las muestras fueron analizadas en el

Servicio de Genómica Bioinformática de la UAB, que para la reacción de la qPCR utilizó el SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, EE. UU.). Las condiciones de amplificación y de normalización de las muestras fueron las mismas que se mencionan en el apartado 4.7 de esta tesis.

#### **4.13 Transcripción reversa y PCR cuantitativa para el estudio de la expresión de los sistemas QS *pqs* de *P. aeruginosa* y *agr* de *S. aureus* en medio ASM modificado.**

Se realizaron precultivos en 10 mL de LB durante 18h a 37°C/180 rpm, para cada una de las cepas co-aisladas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* descritas en el apartado cepas de estudio/4.3. Se realizó una resiembra a una DO<sub>550nm</sub> de 0,1 para *S. aureus* y de 0,01 para *P. aeruginosa* en 10 mL de una mezcla 1:1 del medio ASM y TSB 0,5X glucosa 1%, y se incubó durante 24h a 37°C/180 rpm. Además, se cultivó cada cepa por separado en este medio como control. Primeramente, se realizó el tratamiento de cada muestra de cultivo con el reactivo RNAProtect (Qiagen, EE.UU.), según descrito anteriormente, y se congeló a - 80°C hasta la etapa de extracción del RNA. Se normalizaron las cantidades de células en estas muestras tratadas antes del aislamiento del RNA, según el recuento de UFC/mL obtenidos previamente. De este modo una cantidad de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/mL de cada aislado puro ó 2x10<sup>6</sup> células/mL de los cultivos mixtos fueron tratados con lisostafina (AMBI products, EE.UU.) a una concentración de 200 µg/mL y lisozima (Sigma-Aldrich, EE.UU.) a 400 µg/mL disueltas en tampón tris- EDTA. Tras una incubación de 60 min, seguido de un tratamiento con proteinasa K durante 30 min, se procedió a la extracción y cuantificación del RNA, a la comprobación de la ausencia de DNA y especificidad de los cebadores, y a la transcripción reversa, según los procedimientos descritos en el apartado anterior. Las muestras fueron analizadas en el Servicio de Genómica Bioinformática de la UAB, a través del método descrito anteriormente. Además de las condiciones de amplificación y de normalización de las muestras, descritas en el apartado 4.7 para el sistema *Agr* de *S. aureus*, y que también fueron utilizadas en este ensayo, se añadieron los cebadores para el gen *pqsL* de *P. aeruginosa* [*pqsL*FW: 5'-CGGTATCGCCTCCTACGTG-3'; y *pqsL*RV: 5'GGAAGCTCACCACCAGTCG-3'], y para normalizar la expresión respecto a un gen constitutivo, los cebadores del gen *rpoD* [*rpoD*FW: 5'- CGATCGGTGACGACGAAGAT -3'; y *rpoD*RV: 5'- GTCACATCGAACTGCTTGCC-3'], que codifica el factor sigma de la RNA polimerasa (175).

#### **4.14 Métodos estadísticos**

El análisis estadístico para el objetivo 1 incluyó: un análisis descriptivo, un análisis univariante y análisis multivariante, mediante un modelo de regresión logística, combinando variables cualitativas y cuantitativas. Para la comparación de las variables numéricas se utilizaron las pruebas de U de Mann-Witney o ANOVA, mientras que para las variables categóricas se utilizó la prueba Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson o Fisher. En el

modelo de regresión logística, considerando como variable dependiente el aislamiento persistente de *S. aureus*, se incluyeron únicamente las variables que resultaron significativas en el análisis univariante. De igual manera se procedió para realizar el análisis multivariante para la mortalidad y el desarrollo de complicaciones.

El análisis estadístico para el objetivo 2, incluyó principalmente la comparación de variables categóricas mediante Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson o Fisher. Se consideraron los valores de Kappa (k) inferiores a 0,4 como indicativos de una correlación débil; entre 0,41 y 0,6 de una correlación buena y los valores por encima de 0,6 como una correlación fuerte. Además, también se realizó un análisis uni/multivariante para evaluar la funcionalidad del sistema Agr en función de las distintas variables clínicas y microbiológicas recogidas. En el objetivo 3, la comparación de los datos fenotípicos de las cepas, se realizó mediante la prueba t-test no pareada.

En todos los análisis las asociaciones se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de  $p$  fue  $< 0,05$ . Los datos se analizaron con los programas IBM®SPSS®15.0 (SPSS Inc, EE. UU.) y GrapPad Prism 5 (GraphPad Inc, EE. UU.).

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 5.1 Influencia de los factores del microorganismo y del hospedador en el aislamiento persistente de *S. aureus*, y en la evolución clínica de pacientes sometidos a ventilación mecánica (Objetivo 1)

---

La presencia de *S. aureus* en el tracto respiratorio es uno de los ejemplos que demuestra la capacidad de adaptación y regulación de la virulencia por parte de este microorganismo, que al ocupar diferentes nichos, es capaz desde colonizar de forma asintomática las fosas nasales hasta diseminarse y establecer una infección grave e invasiva (60, 204). Evaluar los factores clínicos y microbiológicos que están implicados en las ITRI causadas por *S. aureus*, y poder distinguir entre los que están asociados a la colonización y a la infección, es de suma importancia por la implicación en la prescripción y el uso adecuado de los antibióticos (14). En este objetivo de la tesis se estudió en un grupo de pacientes críticos sometidos a VM, la relación e influencia de distintos factores del microorganismo y del hospedador con el aislamiento persistente de *S. aureus* en muestra respiratoria, a pesar del tratamiento ajustado al perfil de susceptibilidad antibiótica; además de su impacto en la evolución clínica. Parte de los resultados obtenidos en este objetivo fueron publicados en el artículo 1.

#### 5.1.1 Características clínicas y epidemiológicas en función del grupo de estudio y de la evolución clínica

En el periodo de tiempo comprendido entre el 1 de enero de 2012 y el 31 de diciembre de 2013, 1171 pacientes fueron ingresados en la UCI del HUGTiP. Un total de 3012 muestras de AT fueron procesadas. Se detectó un 3,33% de portadores nasales MRSA, que correspondieron a 39 pacientes. Se aislaron 270 cepas de *S. aureus* (8,96%, siendo el segundo microorganismo más frecuente después de *P. aeruginosa*) correspondientes a 121 pacientes que fueron clasificados, según los criterios definidos, en 27 casos de neumonía, 45 de traqueobronquitis y 49 de colonización bronquial. El porcentaje global de cepas MRSA en muestras de AT fue de 18,2% (22 pacientes).

De los 39 pacientes portadores nasales MRSA, 11 (28,2%) de ellos presentaron aislamiento consecutivo de *S. aureus* en muestras de AT. Tres pacientes desarrollaron neumonía, dos traqueobronquitis y seis fueron considerados colonizados. En todos estos casos el aislamiento posterior fue por cepas MRSA, excepto para uno de los pacientes del grupo de colonización bronquial en que el aislamiento fue MSSA.

En cuanto a las características clínicas y epidemiológicas de la población de estudio, la media de edad fue de 59,1 años (DE: 16,6) y el 63,6% (77 pacientes) eran varones. El 75,2% de la población presentó alguna enfermedad subyacente, siendo la diabetes la más frecuente con 27,3% de los casos. Los motivos de ingreso en la UCI fueron el 70,2% médico, 21,5% quirúrgico y 8,3% traumático. Se observó el compromiso vascular o traumático del sistema nervioso central en 42,1% de los casos, y la media del APACHE-II

fue de 18,7 (DE: 8). La media de días con VM hasta el primer aislamiento, en caso de las cepas MRSA fue de 6,91 (DE: 7), mientras que para las cepas MSSA fue de 6,25 (DE: 8). Un total de 21 pacientes (17,3%) presentaron hemocultivos positivos, siendo *S. aureus* aislado en nueve de ellos (7,4%). El aislamiento mixto de *S. aureus* con otros microorganismos en la muestra respiratoria se documentó en 35,5% de los casos, siendo 16,3% con *H. influenzae*, 14% con *P. aeruginosa* y 58,1% con otros bacilos Gram negativos. Por otro lado, en 30 pacientes (24,8%) se observó el aislamiento consecutivo de *P. aeruginosa*, que no se relacionó con el perfil de susceptibilidad a la meticilina ( $p=0,766$ ). Las características clínicas y epidemiológicas, así como las comparaciones según el grupo de estudio se resumen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Análisis univariante de las características clínicas y epidemiológicas en función de los grupos de estudio considerados. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje).

Variables clínicas y epidemiológicas	Colonización bronquial (n=49)	Traqueobronquitis (n=45)	Neumonía (n=27)	Valor de P
Edad, años [media (DE)]	59,7 (15,2)	57,9 (18,3)	60 (17,3)	0,833
Sexo, (varones)	28 (57,1)	32 (71,1)	17 (63)	0,389
Adquisición de la infección				
Comunitaria	5 (10,4)	6 (13,3)	6 (22,2)	0,172
Nosocomial	43 (89,6)	37 (82,2)	19 (70,4)	
Relacionada con la asistencia sanitaria	-	2 (4,4)	2 (7,4)	
Enfermedades subyacentes	36 (73,5)	33 (73,3)	22 (81,5)	0,713
Diabetes	15 (30,6)	11 (24,4)	7 (25,9)	0,809
Enfermedad pulmonar crónica	12 (24,5)	6 (13,3)	4 (14,8)	0,352
Neoplasia	8 (16,3)	9 (20)	6 (22,2)	0,835
Hipertensión	20 (40,8)	14 (31,1)	7 (25,9)	0,389
Insuficiencia cardiaca	7 (14,3)	8 (17,8)	2 (7,4)	0,500
Insuficiencia renal	3 (6,1)	2 (4,4)	-	0,541
Obesidad	4 (8,2)	1 (2,2)	-	0,280
Inmunosupresión/ Trasplante renal	2 (4,1)	-	3 (11,1)	0,056
Motivo de ingreso UCI				
Médico	33 (67,3)	33 (73,3)	19 (70,4)	0,274
Traumático	4 (8,2)	1 (2,2)	5 (18,5)	
Cirugía programada	9 (18,4)	9 (20)	3 (11,1)	
Cirugía urgente	3 (6,1)	2 (4,4)	0 (0)	
APACHE-II [media (DE)]	19,8 (8,6)	18,1 (7,9)	17,7 (6,9)	0,489
GLASGOW [media (DE)]	9,8 (4,6)	10,2 (4,8)	10,4 (5,0)	0,831
CPIS [media (DE)]	-	3,7 (1,3)	6,8 (1,4)	<0,001 *
Implicación vascular o traumática del SNC	19 (38,8)	17 (37,8)	15 (55,6)	0,305
Isquemia	2 (4,1)	1 (2,2)	2 (7,4)	0,635
Hemorragia	7 (14,3)	7 (15,6)	4 (14,8)	1

Traumatismo craneal	4 (8,2)	2 (4,4)	6 (22,2)	0,061
Otros tipos de implicaciones del SNC <sup>a</sup>	8 (16,3)	8 (17,8)	4 (14,8)	1
Días de estancia en la UCI [media (DE)]	23 (22)	26,4 (24)	27,9 (23,1)	0,628
Días de VM [media (DE)]	24 (22,2)	25,9 (23,7)	27,9 (23,2)	0,773
Días de VM hasta el primer aislamiento de <i>S. aureus</i> [media (DE)]	7,3 (8,8)	6,7 (7,3)	5,2 (9)	0,567
Aislamiento persistente $\geq$ 7 días	14 (48,3)	14 (34,1)	11 (40,7)	0,489
Complicación respiratoria	1 (7,1)	1 (7,1)	12 (85,7)	<0,001 *
Mortalidad relacionada con la infección estafilocócica	2 (4,1)	-	4 (14,8)	0,018 *
Mortalidad global	21 (42,9)	20 (44,4)	7 (25,9)	0,264
Hemocultivo positivo para <i>S. aureus</i>	3 (6,1)	2 (4,4)	4 (14,8)	0,324
Portador nasal previo (MRSA)	6 (12,2)	2 (4,4)	3 (11,1)	0,360
Resistencia a la cloxacilina	10 (20,4)	7 (15,6)	5 (18,5)	0,870
Aislamiento mixto de <i>S.aureus</i>	18 (36,7)	14 (31,3)	11 (40,7)	0,693
Aislamiento consecutivo <i>P.aeruginosa</i> en muestra respiratoria	8 (16,3)	16 (35,6)	6 (22,2)	0,092

UCI: Unidad de cuidados intensivos; SNC: Sistema nervioso central; VM: Ventilación mecánica; APACHE-II: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*; CPIS: *Clinical pulmonary infection score*; <sup>a</sup> Incluye coma anóxico, neoplasia cerebral, epilepsia, encefalopatía y convulsiones; \* Se consideró estadísticamente significativo los valores de  $p < 0,05$ ; Prueba Exacta de Fisher y ANOVA.

Aproximadamente el 60% de los pacientes con AT positivo para *S. aureus* se definieron como infección respiratoria, siendo clasificados en el grupo de traqueobronquitis o neumonía. Los casos restantes se consideraron como colonización bronquial. Ninguna de las variables analizadas permitió una distinción satisfactoria entre los tres grupos de estudio. La presencia de comorbilidades y los valores de APACHE-II y GCS fueron similares entre ellos, así como los días de estancia en la UCI y de VM, que, aunque un poco más alto para los pacientes con neumonía, también fueron prácticamente iguales en los tres grupos.

En general, la mayor parte de los estudios publicados evalúan las diferencias entre la neumonía causada por cepas MRSA y MSSA (205), debido a su importancia en la elección de la terapia antimicrobiana disponible. En nuestro estudio, no se encontraron

diferencias en el resultado respecto a la susceptibilidad a la cloxacilina y los grupos de estudio.

En lo que respecta a la prevalencia de colonización nasal por cepas MRSA, durante el periodo del estudio se observó que únicamente el 3,33% de los pacientes eran portadores de MRSA en el momento de ingreso en la UCI. A pesar de la elevada prevalencia a nivel nosocomial, por lo que respecta al origen comunitario, nuestros resultados corroboran lo que ha sido descrito recientemente, en un estudio multicéntrico en el que hemos participado sobre la neumonía adquirida en la comunidad causada por cepas MRSA, donde se observa que España presenta una prevalencia significativamente menor que otros países (206). Además, vale la pena destacar que, de los portadores nasales previamente identificados, únicamente el 12% de ellos desarrollaron infección respiratoria por *S. aureus*.

En cuanto a la relación entre las características clínicas y epidemiológicas y la evolución clínica, un total de 14 pacientes (11,2%) desarrollaron alguna complicación respiratoria, y seis de ellos fallecieron debido a la infección. El resultado clínico adverso resultó ser más frecuente en los pacientes que presentaron bacteriemia estafilocócica ( $p=0,022$ ), y como ya se había descrito previamente (207), incluso en la ausencia de una definición estándar para NAV (24), en el grupo de los pacientes clasificados como neumonía ( $p<0,001$ ), alcanzando además significación estadística en el análisis multivariante ( $p=0,001$ ; OR: 38,4; IC95%: 4,606-320,165). En el análisis univariante, no se encontraron diferencias estadísticas al considerar el resultado clínico con los días de estancia en la UCI ( $p=0,947$ ), los días con VM ( $p=0,932$ ), la edad ( $p=0,523$ ), APACHE-II ( $p=0,240$ ) y GCS ( $p=0,507$ ). Además, la evolución clínica fue similar independiente de la resistencia a la cloxacilina.

Considerando la mortalidad global, un total de 48 pacientes (39,7%) fallecieron durante el periodo de estudio. Las variables que se asociaron estadísticamente a la mortalidad fueron la presencia de comorbilidades ( $p=0,017$ ), hemocultivo positivo de *S. aureus* ( $p=0,028$ ), ser portador nasal previo de MRSA ( $p=0,025$ ) y presentar aislamiento consecutivo de *P. aeruginosa* en muestra respiratoria ( $p=0,052$ ). Además, los pacientes que murieron eran de mayor edad ( $p=0,004$ ) y tenían un índice de APACHE más alto al ingreso ( $p<0,001$ ).

### **5.1.2 Características genotípicas de las cepas en función del grupo de estudio y de la evolución clínica**

Con el objetivo de evaluar si algún factor de virulencia estaría relacionado con la capacidad de causar infección respiratoria, se caracterizaron las cepas aisladas desde el punto de vista genotípico. Para ello, se incluyó además un grupo control de 27 pacientes asintomáticos portadores nasales de *S. aureus* también admitidos en la UCI durante el mismo periodo de estudio. Seis de ellos fueron portadores de MRSA (22,2%) y 21 de MSSA. El 66,7% eran varones y la media de edad fue de 59,5 años (DE: 16,3).

Considerando los pacientes de los 3 grupos de estudio (neumonía, traqueobronquitis, colonización bronquial) y del grupo control de portadores nasales, un total de 148 aislados clínicos de *S. aureus* (un aislado por paciente), siendo 28 de ellos MRSA (18,9%), fueron caracterizados fenotípicamente (identificación y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana) en el momento de la inclusión en el estudio. De manera retrospectiva, 110 de estos aislados fueron analizados genotípicamente (Tabla 6) mediante el *microarray S. aureus genotyping*. Para los 38 casos restantes, no se disponía de las cepas.

El resultado del *microarray*, resumido en la tabla 6 (ya que únicamente se muestran los resultados para 12 factores de virulencia, de los 180 que detecta el array), reveló que las cepas MSSA y MRSA pertenecían a 19 y a 6 complejos clonales, respectivamente. La distribución de CC entre los aislados MSSA fue muy heterogénea, con predominio del CC30 (principalmente en el grupo de estudio portador nasal asintomático), CC5 y CC45. Con respecto a los aislados MRSA, el CC5 (61,9%) fue el más frecuente en todos los grupos de estudio. Existen escasos estudios sobre la asociación de determinados CC y aislados de muestras respiratorias del tracto respiratorio inferior. Sin embargo, en lo que respecta a la distribución de linajes específicos entre los aislados MSSA y MRSA, nuestros resultados están de acuerdo con un estudio anterior realizado en España (208) donde se observa la misma diversidad de CC entre las cepas MSSA, y el predominio del CC5 en cepas MRSA. Además, recientemente se ha reportado (209) que el CC30 es el linaje más frecuente en el individuo sano portador nasal de cepas MSSA en España, lo que corrobora también los datos obtenidos en este estudio.

La distribución de los alelos del sistema regulador Agr fue bastante heterogénea entre los diferentes grupos de estudio, y no se observaron correlaciones estadísticamente correlativas entre ambas variables ( $p=0,107$ ). Por otro lado, la distribución de los alelos *agr* en el grupo de los aislados provenientes de pacientes que presentaron una evolución adversa fue: I (38,9%), II (55,6%) y III (5,6%); mientras que para el grupo de pacientes sin desarrollo de complicaciones respiratorias y/o muerte relacionada fue: I (40%), II (40%), III (16,9%) and IV (3,1%). A pesar de una frecuencia mayor del alelo *agr* III en el grupo de los pacientes sin complicaciones respiratorias, tampoco se observó una correlación significativa entre el resultado clínico y el tipo de alelo *agr* ( $p=0,457$ ). Con

respecto a otros sistemas reguladores, diferentes del sistema Agr, todas las cepas fueron positivas para los locus *sae* y *vraS*.

Dado el elevado número de genes (considerando el genoma *core* de *S. aureus* y los elementos genéticos móviles) que codifican para distintos factores de virulencia, lo más probable es que diferentes sistemas reguladores, mediante la expresión génica de varias proteínas están involucradas en la patogénesis (112). Respecto a los factores secretados y de adhesión, todas las cepas fueron positivas para los genes que codifican la  $\alpha$ -hemolisina (*hla*),  $\delta$ -hemolisina (*hld*), proteína A estafilocócica (*spa*) y factor de aglutinación A y B (*clfA* y *clfB*). Ningún aislamiento fue positivo para el elemento genético móvil ACME (del inglés *arginine catabolic mobile element*), ni los genes de la resistencia a vancomicina A (*van A*) y de la proteína superficial involucrada en la formación de *biofilm* (*bap*). Los demás genes presentaron una frecuencia variable entre los diferentes grupos de estudio. Una única cepa fue positiva para el gen *luk-PV*, que correspondió a un paciente con traqueobronquitis con evolución favorable.

Dado que el *microarray* proporciona información sobre un número de genes muy elevado, también se realizó una aproximación mediante *whole genome association studies* (WGAS). Este análisis se realizó en colaboración con el Dr D. Wilson (Oxford, UK) y se basó en el uso de una herramienta estadística descrita por su grupo (<http://www.danielwilson.me.uk/virulogenomics.html>). No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los genes representados al comparar casos persistentes y no persistentes (Anexo 4).

Aunque el *microarray* utilizado en este estudio no evalúa la expresión de las toxinas codificadas por los diferentes genes de virulencia, hay que tener en cuenta que todas las cepas fueron positivas para el gen que codifica para la  $\alpha$ -toxina, que previamente ha sido descrita, junto con la  $\beta$ -toxina, contribuir en la patología pulmonar (205, 210, 211). Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre las características genotípicas de los aislados y la evolución clínica desfavorable, incluso cuando se analizaron los grupos de estudio por separado.

No obstante, la NAV puede conllevar a una estancia prolongada en la UCI, así como la necesidad de más días de VM, por lo que estas dos variables también se analizaron en el contexto de la evolución clínica. Entre los resultados obtenidos de estos análisis, se observó que para los pacientes del grupo de colonización bronquial, la presencia de los genes *fnbB* y *cna*, que codifican MSCRAMMs y participan en la adhesión a las mucosas (212), se correlacionaron con los días de estancia en la UCI. El gen de la proteína de unión al fibrinógeno (*fnbB*) se correlacionó con una estancia prolongada en la UCI ( $p=0,050$ ). Sin embargo, el gen que codifica para la proteína de unión al colágeno (*cna*) se correlacionó inversamente con la estancia en la UCI y los días con VM ( $p<0,0001$ ). Estos resultados podrían estar relacionados con las condiciones fisiológicas de la mucosa respiratoria de estos pacientes

Finalmente, cabe destacar que cuando se analizaron los datos mediante un método exploratorio de datos, realizado a través del *software* "AutoDiscovery" (Butler Scientifics S.L., [www.butlerscientifics.com](http://www.butlerscientifics.com)) (Anexo 5), se observó que la presencia del gen *hlyB* ( $\beta$ -hemolisina), en el grupo de pacientes con neumonía, se asoció con más días de VM, mayor estancia en la UCI y más días transcurridos desde el inicio de la intubación hasta el primer aislamiento de *S. aureus*. Además, se analizaron las relaciones existentes con los genes *chp* (proteína inhibidora de la quimiotaxis) y *sak* (estafiloquinasa) que están incluidos en el bacteriófago que se inserta y trunca el gen *hlyB*. Se observó que la presencia de *chp* se asoció con una mayor estancia en la UCI, aunque solamente en el grupo clasificado como pacientes portadores. En cambio, la presencia del gen *sak* se asoció con una mayor estancia en la UCI en el grupo de los pacientes con traqueobronquitis.

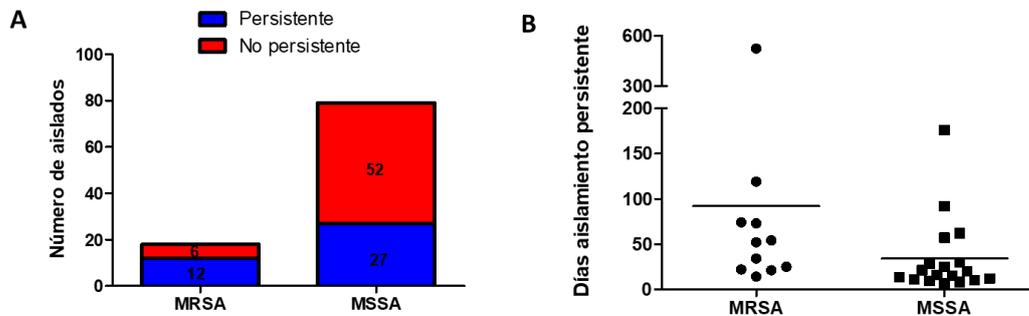
**Tabla 6.** Análisis univariante de las características genotípicas de los aislados clínicos en función de los grupos de estudio. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje).

Sondas de DNA ( <i>microarray</i> )		Portador nasal (n=26)	Colonización bronquial (n=30)	Traqueo- bronquitis (n=33)	Neumonía (n=21)	P
Cepas MSSA		21 (80,8)	24 (80)	27 (81,8)	17 (81)	
Complejo clonal (CC)	CC30	9 (42,9)	4 (16,7)	5 (18,5)	1 (5,9)	0,433
	CC5	1 (4,8)	5 (20,8)	6 (22,2)	5 (29,4)	
	CC45	2 (9,5)	4 (16,7)	3 (11,1)	4 (23,5)	
	CC8	2 (9,5)	2 (8,3)	4(14,8)	1 (5,9)	
	CC15	1 (4,8)	3 (12,5)	3 (11,1)	1 (5,9)	
	CC1	2 (9,5)	1 (4,2)	1 (3,7)	1 (5,9)	
	CC398	2 (9,5)	-	-	1 (5,9)	
	Otros CC	2 (9,5)	5 (20,8)	5 (18,5)	3 (14,3)	
Cepas MRSA		5 (19,2)	6 (20)	6 (18,2)	4 (19)	
Complejo clonal (CC)	CC5	2 (40)	4 (66,7)	5 (83,3)	2 (50)	0,521
	CC22	1 (20)	1 (16,7)	-	1 (25)	
	CC45	1 (20)	-	1 (1,7)	-	
	CC7	1 (20)	-	-	-	
	Otros CC	-	1 (16,7)	-	1 (25)	
Genes reguladores	Alelos <i>agr</i> <sup>a</sup>					0,107
	I	11 (42,3)	11 (36,7)	13 (39,4)	9 (45)	
	II	4 (15,4)	13 (43,3)	14 (42,4)	9 (45)	
	III	11 (42,3)	5 (16,7)	5 (15,2)	2 (10)	
	IV	-	1 (3,3)	1 (3)	-	
	<i>sarA</i>	26 (100)	29 (96,7)	33 (100)	21 (100)	0,7
Resistencia	<i>mecA</i>	5 (19,2)	5 (16,7)	6 (18,2)	4 (19)	1
MSCRAMM	<i>cna</i>	16 (61,5)	12 (40)	11 (33,3)	10 (47,6)	0,168
	<i>fnbA</i>	25 (96,2)	30 (100)	33 (100)	21 (100)	0,353
	<i>fnbB</i>	18 (69,2)	21 (70)	25 (75,8)	18 (85,7)	0,548
Leucocidina	<i>lukS/F-PV</i>	-	-	1 (3)	-	1
Hemolisina	<i>hlyB</i> <sup>b</sup>	21 (80,8)	24 (80)	26 (78,8)	16 (76,2)	0,508
Genes del IEC	<i>chp</i>	16 (61,5)	21 (70)	26 (78,8)	13 (65)	0,507
	<i>scn</i>	21 (80,8)	26 (86,7)	32 (97)	18 (85,7)	0,217
	<i>sak</i>	20 (76,9)	21 (70)	27 (81,8)	15 (75)	0,732
Superantígeno	<i>tst1</i>	11 (44)	6 (20)	9 (27,3)	3 (14,3)	0,107

*agr*: *accessory gene regulator*; *sarA*: *staphylococcal accessory regulator A*; *mecA*: proteína de unión a penicilinas 2A; MSCRAMM: *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule*; *cna*: proteína de unión al colágeno; *fnbA*: proteína de unión a la fibronectina A; *fnbB*: proteína de unión a la fibronectina B; *lukS/F-PV*: Leucocidina de Pantón Valentine; *hlyB*: beta hemolisina; IEC: *immune evasion cluster*; *chp*: proteína inhibidora de la quimiotaxis; *scn*: inhibidor del complemento estafilocócico; *sak*: estafiloquinasa; *tst1*: toxina del síndrome del shock tóxico 1; a Un paciente clasificado como neumonía tenía dos subclones: un subclón era CC45-MSSA *agr*I, y el otro era CC121-MSSA *agr* IV *agr*B I *agr*C I; b El resultado de la sonda del gen *hlyB* puede clasificarse como positivo (porcentaje en la tabla), negativo o truncado. Una cepa del grupo del portador nasal y del grupo de neumonía, respectivamente, presentaba el gen *hlyB* truncado; Valores de *p* obtenidos mediante la prueba Exacta de Fisher.

### 5.1.3 Aislamiento persistente de *S. aureus* en muestra respiratoria: características clínicas y microbiológicas

De los 121 pacientes con aislamiento de *S. aureus* en muestra respiratoria, 97 recibieron tratamiento antimicrobiano, y posteriormente 39 (40,2%) de ellos presentaron un aislamiento considerado como persistente ( $\geq 7$  días). En 12 casos, las cepas fueron MRSA (66,6% de todos los aislados de MRSA) y en 27 casos fueron MSSA (34,1% de todos los MSSA aislamientos) ( $p=0,039$ ) (Figura 14A). De los 12 casos MRSA considerados como persistente, en cinco casos los pacientes eran portadores nasales previos de MRSA. La media de días de persistencia fue más elevada para los aislamientos MRSA [86 (DE: 141,2)], en comparación con los aislamientos MSSA [26,5 (DE: 35,7)] ( $p=0,001$ ), aunque hubo algunos valores atípicos en el grupo MSSA, con más de 50 días (Figura 14B).



**Figura 14.** Aislamiento persistente de MRSA y MSSA en muestra de origen respiratorio. A) Distribución de los casos MRSA y MSSA según si el aislamiento fue persistente / no persistente. B) Distribución de los días de persistencia según el perfil de resistencia a la metilicina;  $p=0,001$  por la prueba t-test no pareada.

En el análisis univariante, se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre el aislamiento persistente y las siguientes variables clínicas y epidemiológicas: edad ( $p=0,009$ ), días de estancia en la UCI ( $p<0,001$ ), días bajo VM ( $p<0,001$ ), CPIS elevado ( $p=0,041$ ), resistencia a la cloxacilina ( $p=0,016$ ) y el aislamiento de *P. aeruginosa* consecutivo al de *S. aureus* en AT ( $p<0,001$ ). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas cuando se consideraron la presencia de comorbilidades y el grupo de estudio, aunque aproximadamente la mitad de los casos de neumonía se consideraron persistentes. Un aspecto importante a destacar es que tampoco hubo diferencias en relación a la evolución clínica, lo que sugiere que el aislamiento persistente podría estar más relacionado con la adaptación del microorganismo al tracto respiratorio, aunque existen algunos factores importantes como el tipo de antibiótico utilizado, la duración y las propiedades farmacocinéticas / farmacodinámicas del antibiótico que también deberían ser considerados.

En el análisis multivariante, las variables que mantuvieron significación estadística fueron el tener una menor edad ( $p=0,003$ ; OR: 0,949; IC 95%: 0,918-0,982) y la resistencia a la cloxacilina ( $p=0,003$ ; OR: 7,891; IC 95%: 1,980-31,454). La relación observada entre el aislamiento persistente y los pacientes más jóvenes, podría estar asociada a las diferencias en la farmacocinética / farmacodinámica de los antibióticos y la respuesta inflamatoria relacionada con la edad.

Así mismo, se recogió la información en cuanto al tratamiento antimicrobiano prescrito después del primer aislamiento de *S. aureus*, y se categorizó como  $\beta$ -lactámicos, vancomicina, quinolonas y linezolid. En un primer análisis simple se observó que la persistencia fue frecuente independientemente del tipo de antimicrobiano utilizado ( $p=0,036$ ).

Si se seleccionan los casos con aislamiento MSSA tratados con  $\beta$ -lactámicos o quinolonas, aproximadamente un tercio de los casos se consideraron persistentes. Aunque se trata de fármacos con una mayor actividad estafilocócica, no tienen actividad intracelular, y todavía se observan casos persistentes, por lo que otros factores a parte de la efectividad del antimicrobiano podrían estar involucrados. En cuanto a los casos MRSA, no hubo diferencias en las frecuencias de casos persistentes cuando se compararon los casos tratados con vancomicina o linezolid, por lo que la biodisponibilidad de la vancomicina a nivel pulmonar no sería el único factor explicativo. No obstante, estas variables serán objeto de estudio en un proyecto posterior, donde se realizará un análisis más exhaustivo considerando factores como los días de tratamiento y las dosis empleadas.

Los antimicrobianos hidrofílicos ( $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y glicopéptidos) al igual que los moderadamente lipofílicos (ciprofloxacina y levofloxacina) conllevan un mayor riesgo de presentar fluctuaciones diarias en las concentraciones plasmáticas que pueden requerir ajustes de dosis (213). A parte de eso, los pacientes críticos pueden presentar variaciones en la distribución del fármaco en el espacio extracelular, así como en su concentración plasmática e intersticial, debido a una serie de mecanismos fisiopatológicos subyacentes, que son frecuentemente observados en este grupo de pacientes como, por ejemplo, la disfunción renal o hepática, la presencia de un estado edematoso, insuficiencia cardíaca entre otros (214, 215).

En cuanto a la gravedad de la enfermedad al ingreso, evaluada mediante el índice APACHE-II, esta fue similar para los casos definidos como persistentes y no persistentes. Por otro lado, se observó que los casos clasificados como persistentes tenían un índice CPIS más elevado, así como mayor estancia en UCI y más días de VM. La presencia de dispositivos invasivos, como el tubo endotraqueal y la traqueostomía, favorecen el riesgo de infección y colonización. De hecho, en aproximadamente 77% de los casos clasificados como persistentes, la persistencia se definió mientras el paciente seguía bajo VM. Esta condición favorece la formación de *biofilm* por *S. aureus* (81), que a su vez

influye directamente en la persistencia bacteriana. Por otro lado, existen diversas evidencias que demuestran que el microorganismo ha desarrollado estrategias que le permiten sobrevivir a nivel intracelular en diversas células eucariotas (fagocíticas y no fagocíticas) (216), lo que corrobora la posibilidad de que pueda también persistir en las vías respiratorias inferiores (88). Independientemente de en qué medio se encuentre *S. aureus*, ya sea embebido en la matriz del *biofilm* o en el interior de la célula eucariota, la eficacia de los antibióticos podría verse afectada, teniendo una actividad reducida o nula, lo que en consecuencia favorecería la colonización y/o persistencia bacteriana.

El aislamiento persistente también fue estadísticamente más frecuente en aquellos casos con aislamiento de cepas MRSA, ya que los tratamientos antimicrobianos como los glicopéptidos tienen peor penetración en el tejido pulmonar y menor actividad intrínseca que los  $\beta$ -lactámicos. Aun así, también se observaron casos de persistencia con aislados MSSA, lo que indica que la resistencia a la cloxacilina no es el único factor que interviene en este fenotipo. Un estudio reciente describió que la exposición de pacientes ventilados a diferentes antibióticos, no reducía de manera eficiente la colonización de la vía aérea inferior por *S. aureus*, ni tampoco evitaba la progresión a la traqueobronquitis asociada a la ventilación o a la NAV (217).

En cuanto al hallazgo, según los datos recogidos en este trabajo, de que el aislamiento consecutivo de *P. aeruginosa* en muestra respiratoria resultó ser más frecuente en los pacientes clasificados como casos persistentes, cabe destacar algunos aspectos. En primer lugar, este hecho abre precedentes para el cuestionamiento de que si también en la ITRI aguda, así como se ha descrito para la infección respiratoria crónica (218), la presencia de *S. aureus* u otros microorganismos representaría un factor de riesgo para la colonización o infección inicial de las vías aéreas por *P. aeruginosa*. Recién se empieza a conocer la composición del microbioma respiratorio (3) y su implicación en la patogenia de las enfermedades respiratorias (219, 220). No obstante, parece ser que la co-colonización o coinfección con cepas de *S. aureus* productoras de  $\alpha$ -toxina, potenciaría la proliferación y la diseminación sistémica de *P. aeruginosa*, lo que podría predisponer al paciente a una ITRI por este microorganismo (221). En estos casos, el aislamiento persistente de *S. aureus* podría tener una implicación clínica relevante a ser considerada. Este hallazgo se debe investigar con mayor profundidad y en el objetivo 3 aportamos nuevos conocimientos sobre este tipo de relaciones interespecíficas.

En relación a las características genéticas de las cepas aisladas (presencia o ausencia de los genes seleccionados) no se encontraron diferencias significativas al comparar las cepas persistentes y no persistentes, con la excepción de gen *sak* (estafiloquinasa), cuya presencia fue más frecuente en los casos no persistentes ( $p=0,043$ ). Como se ha descrito anteriormente, el gen *sak* codifica una molécula implicada en la evasión inmunitaria, y se encuentra juntamente con los genes *chp* y *scn*, en el bacteriófago  $\phi$ Sa3. A través del proceso de transducción, este bacteriófago se integra en el gen cromosómico de la  $\beta$ -

hemolisina (*hly*), lo que altera su producción (222, 223). El fago sirve como regulador de la expresión de algunos de los genes de virulencia y su expresión se induce diferencialmente de acuerdo con el nicho ambiental y el tratamiento antimicrobiano (211). Es importante mencionar en este punto, que se ha realizado una caracterización genética de todos los aislados mediante *whole genome sequencing*, y desde el punto de vista del microorganismo, los resultados obtenidos nos permitirán explorar las distintas correlaciones de manera más específica.

Por último, también hay que mencionar las limitaciones del estudio. En un primer lugar, la selección de los pacientes se realizó de forma retrospectiva, a partir de los cultivos bacteriológicos obtenidos de muestras de frotis nasal y/o AT que fueron positivos para *S. aureus*. Destacar que el cultivo de AT se realizó cuando el paciente presentaba sospecha clínica de infección respiratoria y no se realizaba de manera rutinaria. De este modo, los portadores asintomáticos de *S. aureus* en muestra de AT no fueron incluidos. Por lo tanto, uno de los objetivos principales fue intentar discernir si se trataba de infección o colonización bronquial, con la consiguiente necesidad de indicación de tratamiento antimicrobiano. Otro factor a tener en cuenta fue la adecuación del tratamiento antibiótico, que se consideró de acuerdo con los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, pero las características farmacodinámicas y farmacocinéticas de cada uno de los antimicrobianos, así como la capacidad de penetración pulmonar y la actividad bactericida, bacteriostática o intracelular no fueron analizadas.

Otra de las limitaciones del estudio hace referencia a la definición de la variable "aislamiento persistente" en el tracto respiratorio inferior, debido a la falta de un criterio de referencia. Se estableció inicialmente mediante un punto de corte superior a 72h, que es el mismo utilizado para definir bacteriemia persistente. Posteriormente, debido a las diferencias y distintas implicaciones entre la bacteriemia persistente (teniendo en cuenta que la sangre es un líquido estéril, y por lo tanto un aislamiento persistente es sinónimo de la no eliminación del patógeno responsable) y el aislamiento en muestra de origen respiratorio, dado que las vías respiratorias pueden no ser estériles, se realizaron nuevos análisis utilizando un punto de corte igual o superior a siete días, que es el criterio utilizado generalmente en la práctica clínica para repetir la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, en los casos de re- aislamiento durante el tratamiento.

Y, finalmente, la información genotípica que proporciona el DNA *microarray*, es limitada, ya que no está representado todo el genoma bacteriano completo, y, por otro lado, proporciona información relativa a la presencia o ausencia del gen y/o su variante alélica, y no de la expresión relativa de las proteínas de interés. No obstante, la producción de  $\alpha$ -toxina, detectada posteriormente en este grupo de aislados clínicos, resultó correlacionarse con el resultado clínico adverso, siendo más frecuente en los pacientes con neumonía, aunque no se asoció con el aislamiento persistente (Anexo 6).

Existe una necesidad creciente en identificar los pacientes que presentan un riesgo mayor de desarrollar infección y evolución clínica desfavorable. El análisis de la expresión génica y / o la detección de proteínas, realizado directamente a partir de las muestras clínicas, podría ser un factor determinante en este aspecto. Distinguir aquellos pacientes que requieren de tratamiento antibiótico, tendría un impacto en la evolución clínica a la vez que se generaría una menor resistencia a los antimicrobianos.

Los estudios futuros en cuanto a esta problemática deberán profundizar en la adaptación de *S. aureus* durante las infecciones pulmonares, identificando factores del hospedador y factores del microorganismo que juegan un papel en este fenotipo. Un estudio multicéntrico, en el contexto del programa *Innovative Medicines Initiative (IMI) New Drugs for Bad Bugs*, que incluye múltiples variables epidemiológicas, clínicas y microbiológicas, se está llevando a cabo actualmente para ayudar a dilucidar la importancia real de las características moleculares bacterianas en las ITRI causadas por *S. aureus* en la UCI (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02413242>). Además, se están llevando a cabo diferentes ensayos clínicos evaluando terapias basadas en el uso de anticuerpos monoclonales, dirigidos específicamente contra determinados factores de virulencia de *S. aureus*, con resultados prometedores en cuanto a la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades graves causadas por este microorganismo (224). Por otro lado, también es importante, en el caso del tracto respiratorio inferior, de definiciones de consenso para infección y colonización bronquial. Estas bases permitirán una caracterización detallada de los grupos de estudio, además de optimizar el tratamiento antimicrobiano, donde a parte de considerar el resultado de un cultivo bacteriano positivo, también se podría identificar los factores del microorganismo que contribuyen a la virulencia, e iniciar así una terapia personalizada.

## 5.2 Importancia clínica del sistema Agr y su implicación en la adaptación de *S. aureus* al tracto respiratorio (Objetivo 2)

El primer objetivo de este estudio consistió en evaluar la actividad del sistema Agr en los aislados clínicos de *S. aureus* obtenidos del tracto respiratorio inferior, ya que la mayoría de los estudios publicados utilizan cepas de referencia o aislados provenientes de otros focos de infección (144, 192, 193). A partir de este análisis, y debido a la importancia de este sistema en la patogenicidad estafilocócica, descrita en varios modelos animales, se estableció como segundo objetivo el estudio de la correlación entre la funcionalidad del Agr y las variables clínicas y microbiológicas, así como su impacto en la capacidad de formación de *biofilm*. Parte de los resultados obtenidos en este objetivo fueron publicados en el artículo 2.

### 5.2.1 Caracterización de las cepas clínicas y los grupos de estudio

Se analizaron 148 cepas clínicas (aisladas de 142 pacientes descritos anteriormente en el apartado 4.3/Figura 8), siendo 25 (16,9%) MRSA y 123 (83,1%) MSSA (Tabla 7). Once pacientes (8,9%) fueron portadores nasales previos de MRSA. Por otro lado, seleccionando los 111 pacientes que presentaron infección (ITRI y bacteriemia), la adquisición fue de origen nosocomial en 94 casos (84,7%), comunitaria en 14 (12,6%) y relacionada con la asistencia sanitaria en tres (2,7%). Se observó una alta diversidad de CC entre los aislados. En el caso de los aislados MSSA, los CC más frecuentes fueron el CC30 (22%), CC5 (17,9%) y el CC45 (17,1%), mientras que para los aislados MRSA, el CC5 (72%) fue el más frecuente, seguido del CC22 (16%). Este dato está de acuerdo con estudios previos realizados, donde se observa la prevalencia del CC5 en cepas MRSA provenientes de España (208).

**Tabla 7.** Distribución de la resistencia a la meticilina y alelos *agr* de acuerdo a los grupos de estudio. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje).

ITRI: Infección de tracto respiratorio inferior; *agr*: *accessory gene regulator*; <sup>a</sup> Otras ITRI incluyen:

Cepas por grupos de estudio (n)	MRSA	Alelos <i>agr</i> <sup>b</sup>			
		I	II	III	IV
Neumonía (22)	4 (18,2)	10 (45,5)	9 (40,9)	2 (9,1)	1 (4,5)
Traqueobronquitis (35)	8 (22,9)	15 (42,9)	14 (40,0)	5 (14,3)	1 (2,9)
Colonización bronquial (29)	7 (24,1)	11 (37,9)	13 (44,8)	4 (13,8)	1 (3,4)
Otras ITRI (9) <sup>a</sup>	3 (33,3)	5 (55,6)	4 (44,4)	0 (0)	0 (0)
Subtotal ITRI (95)	22 (88)	41 (67,2)	40 (78,4)	11 (33,3)	3 (100)
Portador nasal (35)	2 (5,7)	13 (37,1)	7 (20,0)	15 (42,9)	0 (0)
Bacteriemia (18)	1 (5,6)	7 (38,9)	4 (22,2)	7 (38,9)	0 (0)
Total de aislados (148)	25 (16,8)	61 (41,2)	51 (34,5)	33 (22,3)	3 (2,0)

neumonitis: una cepa; neumonía por broncoaspiración: tres cepas; aislamiento en muestra de traqueostomía: cinco cepas; <sup>b</sup> resultados obtenidos por la hibridación de las sondas de DNA del *microarray*.

### 5.2.2 Funcionalidad del sistema Agr

La actividad o funcionalidad del sistema Agr puede determinarse mediante métodos fenotípicos cualitativos (detección de  $\delta$ -hemolisina) y cuantitativos (cuantificación de  $\delta$ -hemolisina), así como por métodos genotípicos (cuantificación del nivel de expresión del gen *rnaIII*). Los 148 aislamientos, correspondientes a los tres grupos de estudio descritos en la tabla 7 [ITRI (n = 95), portador nasal (n = 35) y bacteriemia (n = 18)], se analizaron inicialmente usando dos métodos fenotípicos cualitativos: la prueba de CAMP y el VLT (apartado 4.6). Se detectó un Agr funcional en 118 y 125 cepas (79,7% y 84,5%), respectivamente, y la concordancia entre ambas pruebas fue de 85,8% (127/148) ( $\kappa$ : 0,519; SE: 0,091) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Concordancia entre la prueba de CAMP y el VLT. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje).

Prueba de CAMP	VLT		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	111 (94,1)	7 (5,9)	118 (79,7)
Negativo	16 (53,3)	14 (46,7)	30 (20,3)
Total	125 (84,4)	23 (15,6)	148 (100)

VLT: test de lisis de vesículas

Analizando la funcionalidad del Agr y la concordancia entre ambas pruebas, considerando cada grupo de estudio de forma independiente, se observó que en el grupo de ITRI la actividad de Agr fue funcional en 77 (81,1%) y 79 (83,2%) cepas, usando la prueba de CAMP y VLT, respectivamente. La concordancia entre ambas pruebas fue del 85,2% (81/95) ( $\kappa$ : 0,499; SE: 0,116). En el grupo de los portadores nasales, el sistema Agr resultó funcional en 28 (80%) y 29 (82,9%) cepas por la prueba de CAMP y VLT, respectivamente, con una concordancia del 91,4% (32/35) ( $\kappa$ : 0,717; SE: 0,153). Por último, en el grupo de bacteriemia, el sistema Agr fue funcional en 13 (72,2%) y 17 (94,4%) cepas, usando la prueba de CAMP y VLT, respectivamente, con una concordancia del 77,7% (14/18) ( $\kappa$ : 0,265; SE: 0,220).

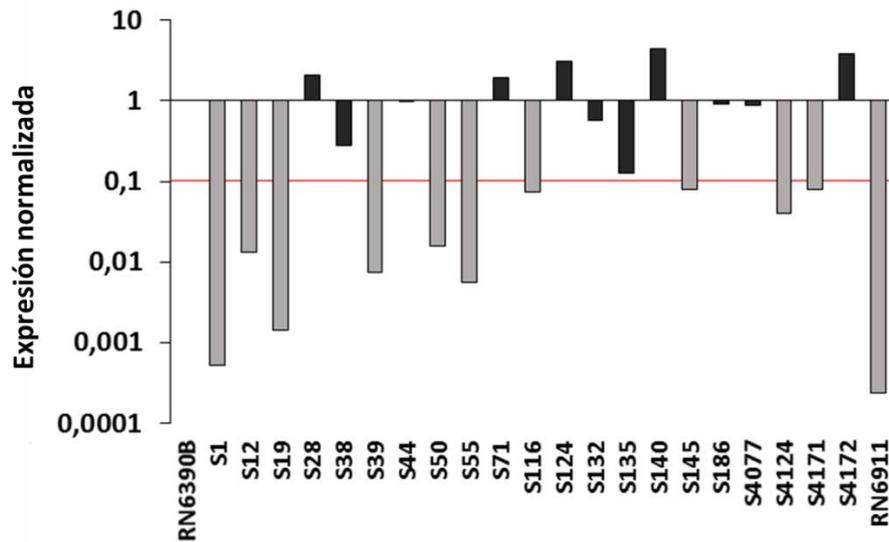
Un total de 21 cepas presentaron un resultado discordante entre las pruebas de CAMP y VLT (Tabla 9), siendo 14 de ellas proveniente del grupo ITRI, tres de portadores nasales y cuatro de bacteriemia.

De las 21 cepas con resultados discordantes, siete de ellas mostraron sinergia entre las  $\delta$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ - hemolisinas en placas de agar sangre, y fueron consideradas como positivas por la prueba de CAMP, según descrito previamente (193). Sin embargo, para estas cepas se

observó una baja intensidad de la señal de fluorescencia cuando fueron comparadas con el control negativo en la prueba VLT, y se clasificaron, por lo tanto, como negativas mediante esta prueba. Para las 14 cepas restantes, el patrón de hemólisis se correspondió a la presencia única de  $\beta$ - hemolisina para seis de ellas, y falta de hemólisis para las otras ocho cepas, por lo que la prueba de CAMP se consideró negativa. Sin embargo, cuando se analizaron por VLT, se detectó un aumento de la fluorescencia para estas cepas y, por lo tanto, se clasificaron como positivas para esta prueba. Con el objetivo de determinar con mayor sensibilidad la funcionalidad del Agr en los casos discordantes, se determinaron los niveles de la expresión del RNAlII mediante qRT-PCR (Tabla 9, Figura 15).

**Tabla 9.** Descripción de los casos discordantes entre el VLT y la prueba de CAMP, incluidos el patrón de hemolisina, expresión del gen *rnalIII*, alelo *agr* y el complejo clonal.

Grupo de estudio (n) Identificación de la cepa	VLT	Prueba de CAMP	Prueba de CAMP (Hemolisina)	Expresión <i>rnalIII</i>	Alelo <i>agr</i>	Complejo clonal
Neumonía (2)						
S19	Negativo	Positivo	Alfa y delta	Negativo	II	CC5 /ST5-MRSA-I
S116	Negativo	Positivo	Alfa y delta	Negativo	II	CC1(ST573/772-MSSA)
Traqueobronquitis (8)						
S1	Negativo	Positivo	Alfa y delta	Negativo	I	CC8-MRSA-IV [sea+], Clone Lyon /UK-EMRSA-2
S12	Negativo	Positivo	Alfa y delta	Negativo	I	CC22-MSSA
S28	Positivo	Negativo	Beta	Positivo	I	CC45-MSSA
S44	Positivo	Negativo	Beta	Positivo	III	CC30-MSSA
S50	Negativo	Positivo	Alfa y delta	Negativo	I	CC398-MSSA [PVL+]
S55	Positivo	Negativo	No hemolisina	Negativo	III	CC30-MSSA
S124	Positivo	Negativo	No hemolisina	Positivo	II	CC5-MRSA-IV, clon pediátrico
S132	Positivo	Negativo	Beta	Positivo	II	CC15-MSSA
Colonización Bronquial (3)						
S71	Positivo	Negativo	Beta	Positivo	II	CC5-MSSA
S145	Negativo	Positivo	Alfa y delta	Negativo	II	CC5-MSSA
S186	Positivo	Negativo	No hemolisina	Positivo	III	CC30-MSSA
Otras ITRI (1)						
S135	Positivo	Negativo	No hemolisina	Positivo	II	CC5-MRSA-IV&VI
Portador nasal (3)						
S38	Positivo	Negativo	No hemolisina	Positivo	III	CC30-MSSA
S39	Positivo	Negativo	No hemolisina	Negativo	III	CC30-MSSA
S140	Negativo	Positivo	Alfa y delta	Positivo	II	CC5-MSSA
Bacteriemia (4)						
S4077	Positivo	Negativo	No hemolisina	Positivo	II	CC15-MSSA
S4124	Positivo	Negativo	No hemolisina	Negativo	II	CC5-MSSA
S4171	Positivo	Negativo	Beta	Negativo	III	CC30-MSSA
S4172	Positivo	Negativo	Beta	Positivo	I	CC8-MSSA-SCCfus



**Figura 15.** Niveles de expresión relativa del gen *rnaIII* obtenidos mediante qRT-PCR para las 21 cepas con resultado discordante entre la prueba de CAMP y VLT. Se determinó la expresión del gen de interés relativo al gen constitutivo *gyrA* y los valores se normalizaron además respecto al valor obtenido para una cepa control positivo (RN6390B) (Expresión normalizada eje Y). Se incluyó la cepa RN6911 considerada como control negativo. La línea roja indica el punto de corte utilizado para discriminar las cepas en función de si el sistema Agr es funcional o disfuncional. El aislamiento cuyo nivel de expresión resultó 10 veces menor que el valor del control positivo (expresión normalizada <0,1) fue considerado como Agr disfuncional.

De las 21 cepas discordantes, según la prueba de CAMP y la expresión de *RNAIII*, se observó un Agr funcional en 7 (33,3%) y 11 (52,4%) cepas, respectivamente. La concordancia entre ambos ensayos fue del 23,8% (5/21) ( $\kappa$ : -0,5; SE: 0,183). Por otro lado, de acuerdo con el ensayo VLT y la expresión de *RNAIII*, el Agr resultó funcional en 14 (66,7%) y 11 (52,4%) cepas respectivamente, con una concordancia entre ambas pruebas del 76,2% (16/21) ( $\kappa$ : 0,516; SE: 0,18). Finalmente, y teniendo en cuenta los tres ensayos, se determinó que la actividad del sistema Agr fue positiva en 122 (82,4%) de los 148 aislados examinados (Tabla 10).

**Tabla 10.** Funcionalidad del sistema Agr mediante el consenso entre las tres pruebas realizadas. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje).

Cepas por grupos de estudio (n)	Funcionalidad del sistema Agr *	
	Positiva	Negativa
Neumonía (22)	19 (86,4)	3 (13,6)
Traqueobronquites (35)	27 (77,1)	8 (22,9)
Colonización bronquial (29)	25 (86,2)	4 (13,8)
Otras ITRI (9) <sup>a</sup>	7 (77,8)	2 (22,2)
Subtotal ITRI (95)	78 (82,1)	17 (17,8)
Portador nasal (35)	29 (82,9)	6 (17,1)
Bacteriemia (18)	15 (83,3)	3 (16,7)
Total de aislados (148)	122 (82,4)	26 (17,6)

ITRI: Infección de tracto respiratorio inferior; Agr: *accessory gene regulator*; <sup>a</sup> Otras ITRI incluyen: neumonitis: una cepa; neumonía por broncoaspiración: tres cepas; aislamiento en muestra de traqueostomía: cinco cepas; \*La funcionalidad del sistema Agr se determinó a través de la prueba de CAMP y VLT. Para las cepas con resultado discordante entre ambas pruebas, el resultado se determinó por qRT-PCR.

La sensibilidad de la prueba de CAMP para determinar la funcionalidad del Agr ha sido cuestionada anteriormente en algunos estudios (195). La interpretación de la actividad hemolítica sinérgica puede ser subjetiva y los resultados pueden variar entre diferentes laboratorios, especialmente en los aislados clínicos con actividad hemolítica débil (193). En base a eso, se evaluó la funcionalidad del Agr utilizando tanto la prueba de CAMP como el VLT, un ensayo altamente sensible e específico para detectar las toxinas reguladas estrictamente por el Agr (195). El método genotípico de qRT-PCR para el RNAlII, considerado como el procedimiento de referencia, se utilizó para las cepas con resultado discordante entre los dos ensayos, observándose una mayor concordancia entre este método y el VLT, que entre la prueba de CAMP.

Es conveniente destacar que existen algunas diferencias fundamentales entre los métodos para evaluar la funcionalidad del sistema Agr. Se ha demostrado que el VLT es altamente sensible a las toxinas que son reguladas específicamente por el Agr ( $\delta$ -toxina y PSM $\alpha$ 1-4) a concentraciones  $\mu$ M (195). Consecuentemente el número de aislados con resultado positivo para la funcionalidad del Agr es mayor mediante este método, debido a que alcanza un nivel de sensibilidad superior que la prueba de CAMP.

Otra diferencia que hay que tener en cuenta es que el VLT se realiza a partir del sobrenadante obtenido de un cultivo líquido crecido en condición aeróbica, mientras que la prueba de CAMP se realiza en condiciones estáticas en agar sólido. Se ha descrito que los cultivos aeróbicos inducen la expresión diferencial de los genes de virulencia (225, 226), y esto podría influir en la funcionalidad del Agr. Además, la difusión de toxinas a través de agar sangre puede ser menos eficaz lisando las células que la

interacción de las toxinas con la membrana lipídica de las vesículas, lo que posiblemente influya en la medición de la funcionalidad del Agr.

Para evaluar la función del Agr en las cepas discordantes, se investigó la expresión de la molécula efectora RNAIII, un marcador sustituto de la actividad del Agr, mediante qRT-PCR. La extracción del RNA se realizó a partir de un cultivo en la fase de crecimiento exponencial tardía, inicio de la fase estacionaria (6-8h aproximadamente), donde parece ser que ocurre la expresión máxima del RNAIII (115). Estudios previos han reportado que la transcripción tardía del RNAIII se asocia con fallos en la traducción de la  $\delta$ -y  $\alpha$ -hemolisina, lo que resulta en la disfunción del Agr (193, 227). Por lo tanto, esto podría explicar los casos en que las cepas fueron Agr disfuncional por el ensayo de CAMP y Agr funcional por la expresión del RNAIII, ya que la prueba de CAMP depende de la hemólisis sinérgica impulsada por la expresión de la  $\delta$ -toxina. Por otro lado, cuatro cepas resultaron Agr funcional por el VLT, pero disfuncional por la expresión del RNAIII. Trabajos recientes han demostrado la expresión de las toxinas PSMs a través de una vía independiente del RNAIII, donde la molécula AgrA se uniría directamente al promotor *psm* $\beta$  y  $\alpha$  (126, 228). Esto podría explicar los resultados obtenidos, sin embargo, se requiere de estudios adicionales para validar por completo esta hipótesis.

### **5.2.3 Correlación entre la funcionalidad del Agr y las variables clínicas: aislamiento persistente y pronóstico clínico**

Debido a la importancia del sistema Agr en la patogénesis estafilocócica, descrita ampliamente en los modelos animales, se investigó también su asociación con el hecho de tener un aislamiento persistente en muestra respiratoria y el desarrollo de complicaciones clínicas.

Un estudio realizado previamente asocia la inactividad del sistema Agr con la disminución de la capacidad invasiva de *S. aureus* en la infección pulmonar (229). En este sentido, la disfuncionalidad del Agr podría tener una implicación en la persistencia bacteriana de este microorganismo en el tracto respiratorio. De los 91 pacientes con ITRI que recibieran tratamiento antibiótico, 41(45,1%) de ellos presentaron el aislamiento persistente, superior a 72h (Tabla 11). Sin embargo, al considerar los dos puntos de corte definidos para esta variable, no se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre la funcionalidad del sistema Agr y el aislamiento persistente.

Por otro lado, la presencia de complicación respiratoria se observó en 18 casos (19,6%), y en 5 (5,4%) de ellos, la mortalidad se asoció con la infección respiratoria. A diferencia de lo que está descrito en la literatura, donde parece ser que, en varios modelos animales de infección, la patogénesis estafilocócica está relacionada con un aumento en la expresión y actividad del sistema Agr (230-234), en nuestro estudio no se observaron

asociaciones entre la funcionalidad de este sistema de regulación de virulencia y un desenlace clínico desfavorable (Tabla 11).

De los 18 pacientes que presentaron bacteriemia, 3 (16,7%) de ellos tuvieron hemocultivo positivo después de 72 horas. De estos tres casos considerados como bacteriemia persistente, uno obtuvo un resultado de Agr disfuncional. Se observaron complicaciones en 8 (44,4%) casos, y en uno de ellos se reportó Agr disfuncional: 4 pacientes (22,2%) presentaron metástasis séptica y 4 pacientes (22,2%) presentaron *shock* séptico. No se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre la funcionalidad del Agr y la bacteremia persistente, ni tampoco con el desarrollo de complicaciones y/o mortalidad relacionada (Tabla 11).

**Tabla 11.** Correlación entre la funcionalidad del sistema Agr y las variables clínicas: aislamiento persistente (>72h) y pronóstico clínico para los pacientes con ITRI y bacteriemia. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje).

Variables clínicas		ITRI (n=93)*		Valor de P	Bacteriemia (n=18)		Valor de P
		Funcionalidad del Agr			Funcionalidad del Agr		
		Positivo, n (%)	Negativo, n (%)		Positivo, n (%)	Negativo, n (%)	
<b>Aislamiento persistente (&gt;72h)</b>	No	41 (82)	9 (18)	1	13 (86,7)	2 (13,3)	0,442
	Sí	34 (82,9)	7 (17,1)		2 (66,7)	1 (33,3)	
<b>Complicación clínica/ Mortalidad relacionada</b>	No	59 (79,7)	15 (20,3)	0,509	8 (80)	2 (20)	1
	Sí	16 (88,9)	2 (11,1)		7 (87,5)	1 (12,5)	

\* De los 93 pacientes del grupo de infección del tracto respiratorio inferior (ITRI), no se consideró el aislamiento persistente después de las 72h en dos casos, ya que estos pacientes no recibieron tratamiento antibiótico; Valores de *p* obtenidos mediante la prueba Exacta de Fisher.

#### **5.2.4 Correlación entre la funcionalidad del sistema Agr y características genotípicas y fenotípicas de los aislados clínicos**

Una vez determinada la funcionalidad del Agr en los aislados clínicos (82,4% de ellos considerados Agr positivo) se realizaron análisis para investigar las correlaciones entre algunas variables fenotípicas y genotípicas de las cepas, y la funcionalidad del Agr en los diferentes grupos de estudio.

Cuando se analizó la actividad del sistema Agr, por separado, para los diferentes grupos de estudio (ITRI, Portador nasal y Bacteriemia), se observó el mismo porcentaje de funcionalidad de las cepas, entre un 82% - 83% (Tabla 10). El elevado porcentaje de aislados Agr funcional (82,1%) obtenidos del grupo de ITRI, está de acuerdo a un estudio realizado en un modelo murino de neumonía, donde se observó la regulación positiva de los genes *hld* y *psm* (235). Además, los genes de virulencia regulados por el sistema Agr tienen una función importante en el escape de los macrófagos alveolares (236, 237) y en la lisis de los neutrófilos (66), ambas células pertenecientes a la primera línea de defensa en las infecciones pulmonares.

Numerosos estudios destacan la asociación entre la disfunción del sistema Agr, la bacteriemia persistente y el pronóstico clínico desfavorable (145). Se ha descrito que, en muestra de sangre, durante el crecimiento bacteriano, las apolipoproteínas pueden interferir e inhibir la detección del quórum, afectando directamente la actividad del Agr (238). Además, se ha observado que la disminución en la expresión de toxinas influye positivamente en la capacidad adaptativa de *S. aureus* cuando se incuba en medios suplementados con suero humano (239), y esto podría favorecer el aumento de la producción de las proteínas de superficie celular, que a su vez facilitan la formación de *biofilm*, la evasión de la respuesta inmune y el establecimiento de la infección persistente (145, 180).

En cuanto a la capacidad invasiva de *S. aureus* en pacientes hospitalizados y el pronóstico desfavorable asociado con la bacteriemia persistente, hay que mencionar algunos aspectos. Algunos estudios correlacionan en pacientes con bacteriemia persistente la disfunción del sistema Agr con la mortalidad (240). Sin embargo, parece ser que una combinación entre distintas variables, tales como los factores de riesgo del hospedador, el modo de invasión en el torrente sanguíneo, la cantidad del inóculo y la presión antibiótica están más relacionados con la gravedad del cuadro clínico que propiamente con la funcionalidad del sistema Agr (147, 241) o otras características específicas del microorganismo (242).

Recientemente se ha descrito que las cepas aisladas en casos de bacteriemia presentan una disfunción del Agr de entre 3-82% (144). Esta gran variación puede deberse a diferencias en las pruebas realizadas para determinar la funcionalidad del Agr, el linaje de los aislados y los grupos de pacientes de estudio, así como de los grupos control. En

nuestro estudio y considerando las cepas aisladas durante episodios de bacteriemia, se observó una disfunción únicamente en 3 de los 18 aislados analizados (16,7%).

Otra asociación que resulta ser frecuente, es la que relaciona aislados con el Agr mutante o disfuncional con la resistencia a determinados antibióticos, como los glicopéptidos. Diferentes estudios han asociado esta característica con el desarrollo de cepas GISA, VISA o hVISA frente a la terapia con vancomicina. Estos hallazgos llevaron a la hipótesis de que la inactivación del sistema Agr, juntamente con el mecanismo de resistencia a la vancomicina, la actividad autolítica reducida y el engrosamiento de la pared celular podrían estar relacionados (62, 155, 159, 243). Las cepas Agr mutante o disfuncional parecen presentar una ventaja en cuanto a su capacidad adaptativa o *fitness* sobre las cepas Agr funcional, en presencia de determinados antibióticos. Se ha observado que la presencia y activación del sistema Agr impone un coste biológico al organismo que es mediado por la inducción de la expresión de RNAlII (147). La exposición a diferentes antibióticos en concentraciones subinhibitorias, cada uno dirigido a funciones celulares distintas, parece incrementar notablemente la capacidad relativa del sistema Agr (244). Por lo tanto, el uso extensivo de antibióticos en los hospitales, podría explicar la razón de por qué variantes Agr mutante o disfuncional se aíslan con frecuencia en infecciones nosocomiales causadas por *S. aureus*, pero rara vez se encuentran entre cepas adquiridas en la comunidad (147).

Recientemente ha sido descrito que la expresión del gen *mecA* (gen que confiere resistencia a la meticilina), y su capacidad en comprometer la estructura de la pared celular (composición de peptidoglicanos) o bien la interacción entre las proteínas de la membrana, interfiere en la detección del AIP, impidiendo la activación del sistema Agr y consecuentemente reduciendo la virulencia en cepas MRSA adquiridas en el ámbito hospitalario (245). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos observado diferencias al considerar la funcionalidad del Agr y el patrón de resistencia a la meticilina, ya que el 72% y el 84,5% de los aislados MRSA y MSSA, respectivamente, resultaron tener el Agr funcional.

Algunos estudios relacionan epidemiológicamente determinados alelos o grupos *agr* con algunas enfermedades o determinados pronósticos clínicos (246). Las razones que conllevan a estas posibles asociaciones entre los grupos *agr* y diferentes tipos de infección aún no están bien definidas, pero un mejor conocimiento de este fenómeno podría contribuir a la comprensión de la epidemiología de las infecciones estafilocócicas (107). En este sentido se observó que el alelo *agr* más frecuente en el grupo de ITRI fue el *agrI* (43,2%), seguido del *agrII* (42,1%), *agrIII* (11,6%) y del *agrIV* (3,2%). Para las cepas aisladas de portadores nasales, el *agrIII* (42,9%) fue el más frecuente, seguido de *agrI* (37,1%) y del *agrII* (20%). La distribución del alelo *agr* entre las cepas aisladas pertenecientes al grupo de bacteriemia fueron para el *agr I* y *agr III* (38,9%) y *agrII*

(22,2%) (Tabla 7). Sin embargo, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre la funcionalidad del Agr y el tipo de alelo (Tabla 12).

Al analizar conjuntamente todas las cepas, independientemente del grupo de estudio, no se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre la funcionalidad del Agr y la resistencia a la meticilina, el complejo clonal, el alelo *agr* o la presencia de genes que codifican factores de virulencia. Cuando los grupos se analizaron por separado, se observó una asociación significativa entre la función del Agr y la sensibilidad a la meticilina en los portadores nasales ( $p=0,025$ ). Sin embargo, es probable que este resultado esté influenciado por el número bajo de muestras analizadas en este grupo (Tabla 12).

A parte de los resultados obtenidos de los análisis univariantes (Tablas 11 y 12), también se realizó un análisis multivariante para investigar la relación entre la funcionalidad del Agr y las variables clínicas y microbiológicas, pero tampoco se observaron asociaciones estadísticamente significativas.

**Tabla 12.** Funcionalidad del sistema Agr y características genotípicas, definidas como presencia (Pos) o ausencia (Neg) de genes para factores de virulencia basado en un *microarray* de DNA. Las comparaciones se realizaron para cada grupo de estudio por separado. Los datos se expresan como número de aislados clínicos (porcentaje).

Genes		ITRI (n=95)			Portador Nasal (n=35)			Bacteriemia (n=18)		
		Agr <sup>+</sup> n (%)	Agr <sup>-</sup> n (%)	P	Agr <sup>+</sup> n (%)	Agr <sup>-</sup> n (%)	P	Agr <sup>+</sup> n (%)	Agr <sup>-</sup> n (%)	P
<b>Funcionalidad del Agr</b>										
<i>mecA</i>	Pos	16 (76,2)	5(23,8)	0,519	0 (0)	2 (33,3)	0,025*	1 (6,7)	0 (0)	1
	Neg	62 (83,8)	12 (16,2)		29 (87,9)	4 (12,1)		14 (82,4)	3 (17,6)	
<i>sarA</i>	Pos	77 (81,9)	17 (18,1)	1	29 (82,9)	6 (17,1)	N/A	15 (83,3)	3 (16,7)	N/A
	Neg	1 (100)	0 (0)		-	-		0 (0)	0 (0)	
<i>sak<sup>a</sup></i>	Pos	58 (81,7)	13 (18,3)	0,084	24 (82,8)	5 (17,2)	1	13 (81,3)	3 (18,8)	1
	Neg	20 (87)	3 (13)		5 (83,3)	1 (16,7)		2 (100)	0 (0)	
<i>lukS/F-PVL</i>	Pos	0 (0)	1 (100)	0,169	-	-	N/A	1 (100)	0 (0)	1
	Neg	78 (83)	16 (17)		29 (82,9)	6 (17,1)		14 (82,4)	3 (17,6)	
<i>chp<sup>a</sup></i>	Pos	59 (84,3)	11 (15,7)	0,530	22 (81,5)	5 (18,5)	1	12 (80)	3 (20)	0,558
	Neg	18 (75)	6 (25)		7 (87,5)	1 (12,5)		3 (100)	0 (0)	
<i>scn</i>	Pos	71 (83,5)	14 (16,5)	0,253	26 (83,9)	5 (16,1)	0,546	14 (82,4)	3 (17,6)	0,833
	Neg	7 (70)	3 (30)		3 (75)	1 (25)		1 (100)	0 (0)	
<i>tst1<sup>b</sup></i>	Pos	13 (76,5)	4 (23,5)	0,497	12 (80)	3 (20)	0,853	4 (80)	1 (20)	0,650
	Neg	65 (83,3)	13 (16,7)		16 (84,2)	3 (15,8)		11(84,6)	2 (15,4)	
Alelo <i>agr</i>	I	33 (80,5)	8 (19,5)	0,254	12(41,4)	1 (16,7)	0,461	6 (85,7)	1 (14,3)	0,879
	II	35 (87,5))	5 (12,5)		5 (17,2)	2 (33,3)		3 (75)	1 (25)	
	III	7 (63,6)	4 (36,4)		12 (41,4)	3 (50)		6 (85,7)	1 (14,3)	
	IV	3 (100)	0 (0)		-	-		0 (0)	0 (0)	

*agr*: accessory gene regulator, Agr<sup>+</sup>: Sistema Agr funcional; Agr<sup>-</sup>: Sistema Agr dysfunctional; *sarA*: staphylococcal accessory regulator A, *mecA*: proteína de unión a penicilina 2A, *lukS/F-PVL*: leucocidina de Pantón Valentine, *chp*: proteína inhibidora de quimiotaxis, *scn*: inhibidor del complemento estafilocócico, *tst1*: toxina del síndrome del *shock* tóxico 1, N/A: no aplica. <sup>a</sup>Para una cepa del grupo ITRI, se obtuvo un resultado ambiguo para las sondas correspondientes

en el *microarray S. aureus genotyping*. <sup>b</sup>Para una cepa del grupo de portador nasal, se obtuvo un resultado ambiguo para la sonda correspondiente en el *microarray S. aureus genotyping*. \* Se consideró como estadísticamente significativo los valores de  $p < 0,05$ , obtenidos mediante la prueba Exacta de Fisher.

A pesar de no observarse correlaciones en ninguno de los escenarios analizados (persistencia, evolución clínica desfavorable y factores genéticos del microorganismo), conviene destacar que, en cuanto al aislamiento persistente, otros fenotipos de *S. aureus*, además de la funcionalidad del Agr pueden estar implicados, como por ejemplo el desarrollo de SCV.

Las SCV de *S. aureus*, como se ha mencionado anteriormente, representan una subpoblación de crecimiento lento asociada con las infecciones crónicas, persistentes y recurrentes (247, 248). Las SCV, además de ser fenotípicamente distintas, presentando una pigmentación y una hemólisis reducida, también tienen una mayor capacidad invasiva y de persistencia intracelular (247). Trabajos recientes han observado una tasa de reversión rápida de las SCV al fenotipo de tipo salvaje en los cultivos primarios, que son realizados en el laboratorio a partir de muestras clínicas (98). Sin embargo, en nuestro estudio no se estudió la capacidad de desarrollar SCV por parte de los aislados persistentes.

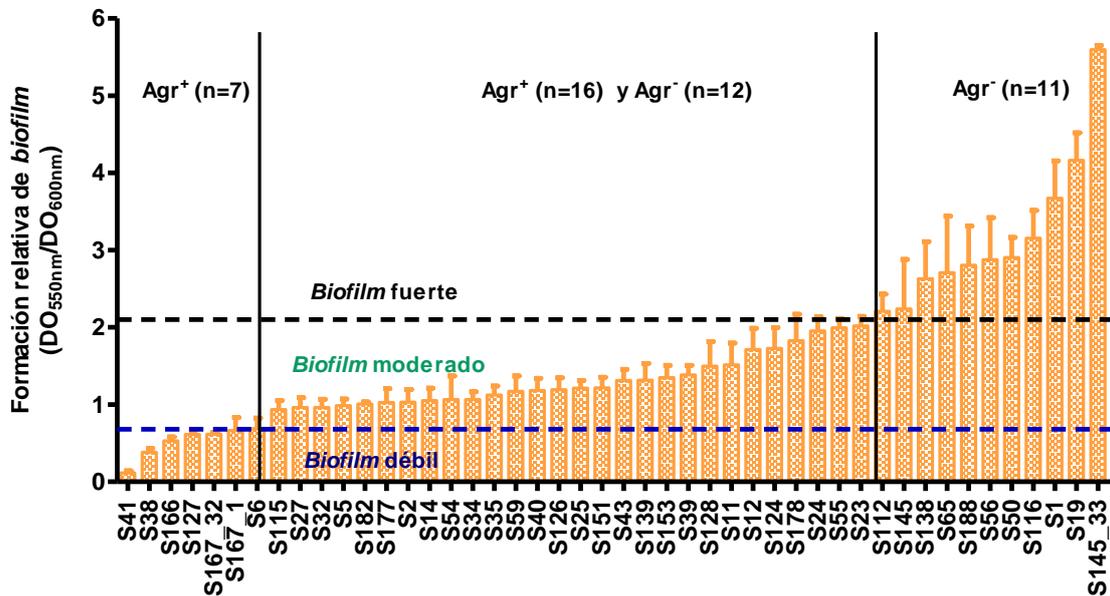
Por último, cabe destacar que la persistencia de *S. aureus* en el tracto respiratorio, parece estar más asociada a una adaptación del microorganismo al nicho ecológico (14) que, a un resultado clínico desfavorable, como ocurre en los casos de bacteriemia.

#### **5.2.5 Correlación entre la funcionalidad del sistema Agr y la formación de *biofilm*.**

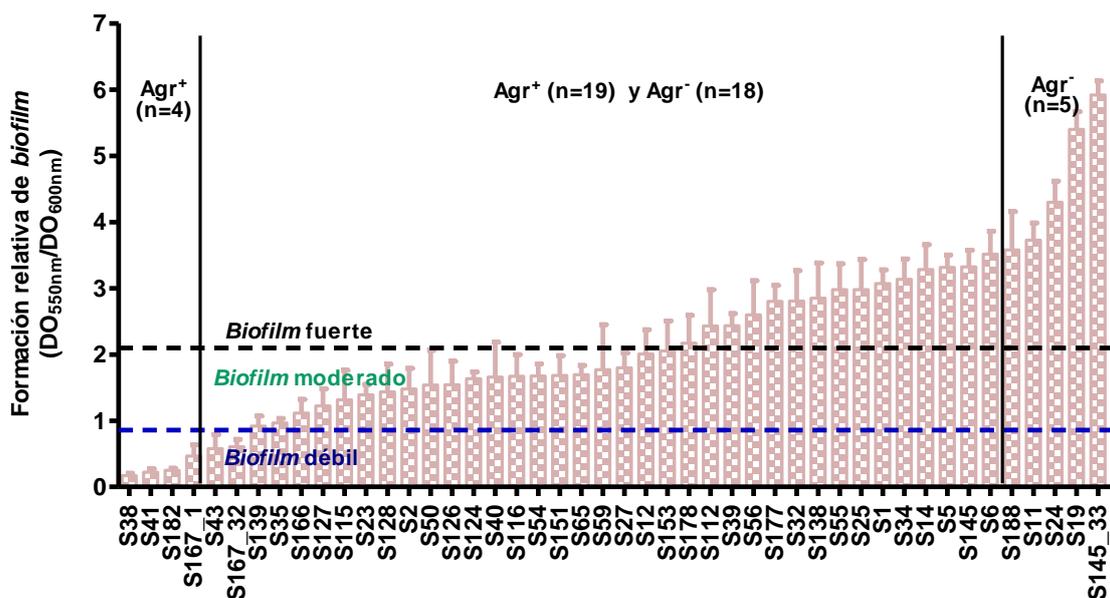
La relación entre el estado del sistema Agr y la formación de *biofilm* también se investigó en algunos aislados incluidos en este objetivo. Se seleccionaron 46 aislados clínicos de *S. aureus* (23 Agr funcional y 23 Agr disfuncional) y se determinó su capacidad de formación de *biofilm* en placas de microdilución. La formación de *biofilm*, para este conjunto de aislados, fue clasificada en débil, moderada o fuerte (apartado 4.10.1), tomando como referencia la cepa de *S. aureus* RN6390B con un Agr funcional (Figuras 16 y 17).

Ningun de los 23 aislados con el Agr funcional formaron *biofilm* fuerte en el medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, como se puede observar en la figura 16, siendo estos aislados considerados como formadores de *biofilm* débil o moderado en el 30,4% y 69,6% de los casos, respectivamente. Al cambiar el medio de cultivo, utilizando la mezcla ASM+TSB, se continuó observando una tendencia entre los aislados con el sistema Agr funcional de formar *biofilm* considerado como débil, y los aislados Agr disfuncional de formar *biofilm* fuerte, pero menos significativa que la observada en el medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%. Se observó que el 26,1% de los aislados formaron *biofilm* fuerte, en cuanto que el 21,7% y el 52,2% formaron *biofilm* débil o moderado, respectivamente (Figura 17). En este estudio se encontraron correlaciones

estadísticamente significativas entre el estado del sistema Agr y la capacidad de formación de *biofilm* (Tabla 13).



**Figura 16.** Formación relativa de *biofilm* en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% para los 46 aislados clínicos de *S. aureus* seleccionadas en base a la funcionalidad del sistema Agr. Las barras representan la formación de *biofilm* relativo (DO550nm CV/DO600nm cultivo) en las placas de microdilución y las líneas de error la desviación estándar de 4 réplicas. Las líneas discontinuas representan los puntos de corte de los valores considerados para formación de *biofilm* débil (azul) y fuerte (negro); el área intermedia entre las líneas discontinuas representa los valores considerados para la formación de *biofilm* moderado; Agr<sup>+</sup> (n): número de aislados con el sistema Agr funcional; Agr<sup>-</sup> (n): número de aislados con el sistema Agr disfuncional.



**Figura 17.** Formación relativa de *biofilm* en la mezcla (1:1) de los medios ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% para los 46 aislados clínicos de *S. aureus* seleccionadas en base a la funcionalidad del

sistema Agr. Las barras representan la formación de *biofilm* relativo (DO550nm CV/DO600nm cultivo) en las placas de microdilución y las líneas de error la desviación estándar de 4 réplicas. Las líneas discontinuas representan los puntos de corte de los valores considerados para formación de *biofilm* débil (azul) y fuerte (negro); el área intermedia entre las líneas discontinuas representa los valores considerados para la formación de *biofilm* moderado; Agr<sup>+</sup> (n): número de aislados con el sistema Agr funcional; Agr<sup>-</sup> (n): número de aislados con el sistema Agr disfuncional.

Estos resultados están en concordancia con estudios anteriores, donde parece ser que, aunque la expresión del sistema Agr puede variar dependiendo de las condiciones del ensayo *in vitro* utilizado (*biofilm* estático o *biofilm* de flujo continuo) y del fondo genético de la cepa (79, 249), la funcionalidad del Agr está generalmente asociada con la inhibición en la formación de *biofilm* (160).

El mecanismo preciso de acción del sistema Agr en el desarrollo del *biofilm* en *S. aureus* sigue siendo objeto de investigación actualmente, y estudios recientes demuestran que este sistema regulador y los péptidos surfactantes, las PSMs, son de gran importancia en los procesos de maduración y dispersión del *biofilm* producido por *este* microorganismo (79, 84, 85, 160). Sin embargo, algunos estudios describen que la capacidad de adhesión o formación de *biofilm* no se ve afectada por la actividad del Agr (250).

Los resultados obtenidos también corroboran lo informado en otro estudio, que describe el aumento en la formación de *biofilm* en las cepas Agr disfuncional (146). En nuestra experiencia, se observó que entre los aislados con el sistema Agr disfuncional, utilizando tanto el medio TSB mezclado o no con el ASM, el 56,5% y el 60,9% de las cepas, respectivamente, formaron un *biofilm*, considerado como fuerte (Tabla 14). Sin embargo, de manera contraria a un estudio anterior que describe las posibles diferencias entre el tipo de alelo *agr* y la producción de *biofilm* (251), en nuestro estudio no se observó ninguna asociación significativa entre estas características.

**Tabla 13.** Correlación entre la funcionalidad del sistema Agr y la capacidad de formación de *biofilm*. Los datos se expresan como número de aislados clínicos (porcentaje).

Funcionalidad del Agr	Formación de <i>biofilm</i>							
	TSB 0,5X glucosa 1%				ASM + TSB 0,5X glucosa 1% (1:1)			
	Débil <sup>a</sup>	Moderado	Fuerte	Valor de P	Débil	Moderado	Fuerte	Valor de P
Positiva (n=23)	7 (30,4)	16 (69,6)	0	0,046*	5 (21,7)	12 (52,2)	6 (26,1)	<0,001*
Negativa (n=23)	1 (4,3)	9 (39,1)	13 (56,5)		1 (4,3)	8 (34,8)	14 (60,9)	
Total (n=46)	8 (17,4)	25 (54,3)	13 (56,5)		6 (13)	20 (43,5)	20 (43,5)	

TSB: *Tryptic soy broth*; ASM: *Artificial sputum medium*. \* Se consideró como estadísticamente significativo los valores de  $p < 0,05$  obtenidos mediante la prueba Exacta de Fisher. a) Las categorías relacionadas con la capacidad de formación de *biofilm* (débil, moderado y fuerte) se describe en el apartado 4.10.1.

### 5.3 Relaciones interespecíficas entre *S. aureus* y *P. aeruginosa*: influencia en el desarrollo de fenotipos de virulencia relacionados con la actividad *quorum sensing* (Objetivo 3)

En este último objetivo de la tesis, se realizaron dos estudios analizando las posibles sinergias o interferencias microbianas entre ambos microorganismos, en el contexto de las ITRI agudas, que involucran fenotipos que podrían facilitar la colonización y/o coinfección, considerando pacientes sometidos a VM. Un primer estudio caracterizó estas interacciones en cinco pares de co-aislados clínicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y en un segundo estudio se analizaron estas interacciones considerando los aislamientos consecutivos de *P. aeruginosa* en muestra respiratoria de pacientes clasificados como casos persistentes de *S. aureus*. Parte de los resultados obtenidos en este apartado fueron recientemente presentados en un congreso de ámbito internacional (Anexo 7).

#### 5.3.1 Estudio de co-aislados clínicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa*

##### 5.3.1.1 Caracterización fenotípica y genotípica de los co-aislados clínicos

Se seleccionaron cinco pares de cepas clínicas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* que fueron co-aisladas de pacientes con sospecha de ITRI aguda (Tabla 14). En primer lugar, los cinco pares de co-aislados clínicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, fueron caracterizados fenotípicamente en cuanto a la susceptibilidad antibiótica.

Todos los aislados de *S. aureus* fueron susceptibles a la cloxacilina, y dos de ellos mostraron resistencia a eritromicina y clindamicina. Además, se realizó la caracterización genotípica y se determinó la funcionalidad del sistema Agr para estos aislados, que se encuentran resumidos en la Tabla 15.

**Tabla 14.** Co-aislados de *S. aureus* y *P. aeruginosa* y características clínicas de los pacientes

Co-aislado	Características clínicas						
	ID	Edad	Sexo	Tipo de muestra	Días de estancia UCI	Días de VM	Complicación respiratoria
1047	75	M	Espuito	-	-	-	Colonización
7244	57	M	AT	18	18	Sí	Traqueobronquitis
2746	77	M	AT	17	17	-	Traqueobronquitis
7115	71	F	AT	64	34	Sí	Traqueobronquitis
5091	35	F	AT	18	5	-	Colonización

AT: aspirado traqueal; UCI: Unidad de cuidados intensivos; VM: ventilación mecánica

**Tabla 15.** Características fenotípicas y genotípicas de las cepas clínicas de *S. aureus* de los pares de co-aislados estudiados en este apartado

ID	Antibiograma <sup>a</sup>						Sistema Agr <sup>b</sup>	Alelo agr <sup>c</sup>	CC <sup>c</sup>	Genes de virulencia <sup>c</sup>			
	CLX	CIP	SXT	CLI	RIF	ERY				sak	chp	scn	tst1
SAR 1047	S	S	S	S	S	S	Neg	III	30	+	+	+	+
SAR 7244	S	S	S	S	S	S	Neg	III	30	-	-	-	+
SAR 2746	S	S	S	R	S	R	Pos	I	398	-	+	+	-
SAR 7115	S	S	S	S	S	S	Neg	IV/I *	121	+	-	+	-
SAR 5091	S	S	S	R	S	R	Pos	II	5	+	+	+	-

a) Antibiograma realizado por difusión en disco; cloxacilina (CLX), ciprofloxacino (CIP), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), clindamicina (CLI), rifampicina (RIF), eritromicina (ERY); Sensible (S); Resistente (R); b) La funcionalidad del sistema Agr fue determinada mediante la prueba de CAMP y qRT-PCR; Negativo (Neg); Positivo (Pos); c) Inferido mediante *microarray* de DNA; \* Resultado ambiguo de la hidridación de la sonda: agr IV/agrC-; *sak*: estafiloquinasa; *chp*: proteína inhibidora de la quimiotaxis; *scn*: inhibidor del complemento estafilocócico; *tst1*: toxina del síndrome del *shock* tóxico: Presencia (+); Ausencia (-).

Todos los aislados de *S. aureus* resultaron positivas en cuanto a la presencia de los genes *hla*, *hly* y *hld*, detectado por *array* de ADN. Dos de los aislados de *S. aureus* estudiados (SAR 1047 y SAR 7244) pertenecían al CC30, un complejo clonal asociado con el estado de colonización nasal (154), complicaciones hematógenas y bacteriemia persistente. Este CC además presenta características genotípicas específicas (252), como por ejemplo la presencia de los genes *tst1* y *cna* (253, 254), ambos positivos en los dos aislados. Por otro lado, en nuestro estudio, el aislado SAR 1047, obtenido de un paciente diagnosticado como colonización bronquial, presentó el gene *hly* truncado debido a la presencia del bacteriófago  $\phi$ Sa3 que transporta los genes asociados con la evasión inmune (*sak*, *chp* y *scn*) (Tabla 15). Hay estudios que informan que los factores de virulencia codificados por este bacteriófago proporcionan una ventaja mayor a *S. aureus* en lo que respecta a la colonización humana (211).

Curiosamente, el aislado SAR 2746 pertenece al CC398, un linaje frecuente en portadores nasales sanos y cuyo principal factor de riesgo de adquisición es la cría o asociación con animales de ganado (254).

Respecto a los aislados de *P. aeruginosa* ninguno de ellos fue resistente a múltiples fármacos. Además, todos resultaron ser productores de pigmentos (piocianina y/o pioverdina) y de la molécula AHL de uno de sus sistemas de QS (Tabla 16).

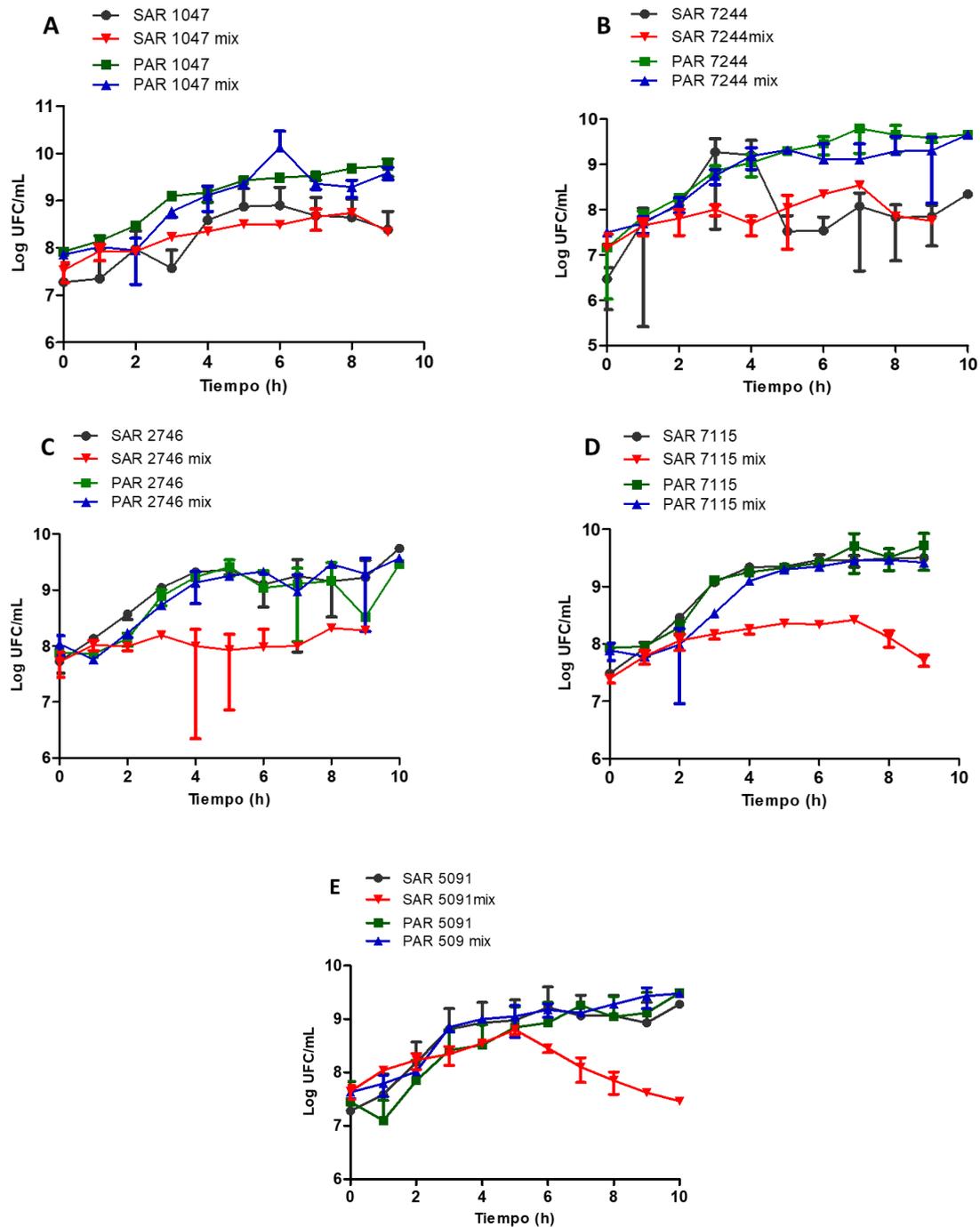
**Tabla 16.** Características fenotípicas y genotípicas de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* de los pares de co-aislados estudiados en este apartado

ID	Antibiograma <sup>a</sup>						Pigmentos <sup>b</sup>	Proteasa <sup>c</sup>	AHL <sup>d</sup>
	PIP	CAZ	GEN	AMK	TOB	CIP			
PAR 1047	S	S	S	S	S	S	+++	-	+
PAR 7244	S	S	S	S	S	S	++	+++	++
PAR 2746	S	S	S	S	S	S	++	++	++
PAR 7115	S	S	S	S	S	S	++	++	+++
PAR 5091	S	S	S	S	S	S	++	++	++

a) Antibiograma realizado por difusión en disco; piperaciclina (PIP), ceftazidima (CAZ), gentamicina (GEN), amikacina (AMK), tobramicina (TOB) y ciprofloxacino (CIP)]; Sensible (S); Resistente (R); b) La producción de pigmentos fue visualizada en placas de medio King agar; c) La producción de proteasa fue visualizada en placas de agar yema de huevo; d) Cuantificación relativa de N-acil homoserina lactona (AHL) determinada mediante el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa con la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55; Producción (+) baja, (++) moderada y (+++) alta.

### 5.3.1.2 Influencia de las relaciones interespecies en el crecimiento planctónico y en la formación de *biofilm*

Las interacciones entre *P. aeruginosa* y *S. aureus* de cada par co-aislado se investigaron inicialmente en cultivos planctónico mixtos con medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%. Se determinó la dinámica de crecimiento de ambas especies en cultivos mixtos durante 10h, partiendo de un inóculo en igual proporción para ambos microorganismos. Las curvas de crecimiento de cada aislado del par clínico, cultivadas individualmente o en cultivos mixto, se muestran en la Figura 18. De manera general y en comparación con los cultivos individuales, *P. aeruginosa* afectó la cinética de crecimiento de su correspondiente co-aislado de *S. aureus* en los pares clínicos 5091, 2746 y 7115. La inhibición en el crecimiento planctónico de *S. aureus* ocurrió probablemente debido a la presencia de exoproductos producidos por *P. aeruginosa*, que actúan suprimiendo la respiración celular de *S. aureus* (255-257).

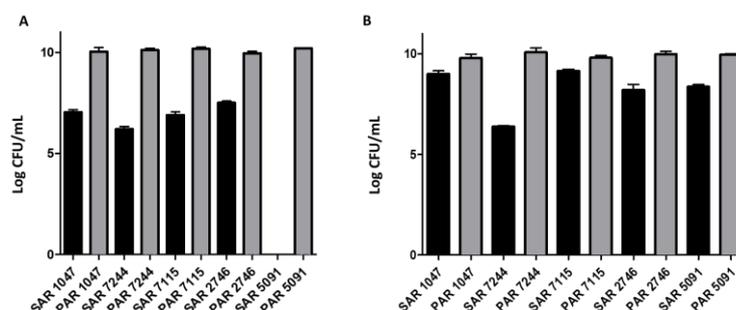


**Figura 18.** Cinética del crecimiento planctónico en medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% durante 10h, para los pares co-aislados clínicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa* (A) 1047; (B) 7244; (C) 2746; (D) 7115 y (E) 5091. Los co-aislados de *S. aureus* (SAR) y *P. aeruginosa* (PAR) del mismo par clínico se cultivaron en cultivo individual y mixto (SARmix o PARMix). El crecimiento del cultivo fue monitorizado mediante el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Los datos representan el promedio de dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas por cepa. Las barras de error indican la desviación estándar de la media

Estudios anteriores demuestran que la presencia de N-acetil glucosamina (GlcNAc), componente del polímero de peptidoglicano de la pared celular de *S. aureus*, induce la expresión de la señal PQS, lo que a su vez aumenta la expresión de moléculas con propiedades antimicrobianas que son reguladas por el sistema QS-*pqs*, como la piocianina y la quinolona HQNO (169, 258).

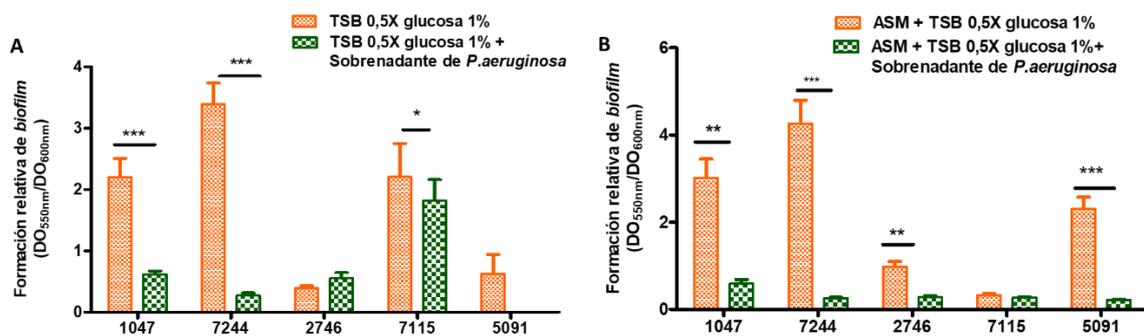
Por otro lado, también se ha descrito que la presencia de AHLs de cadena acilo larga, como la 3-oxo-C12-AHL, de manera directamente proporcional a la concentración, antagoniza el crecimiento y la producción de factores de virulencia en *S. aureus* (170). De acuerdo con las características de los co-aislados de *P. aeruginosa* (Tabla 16), todos ellos resultaron ser productores de AHL. En este sentido, la inhibición en el crecimiento planctónico de *S. aureus*, observada en estos pares clínicos, podría estar relacionado también con la influencia de AHLs, y no únicamente con la presencia de moléculas de efecto anti-estafilocócico.

A continuación, con el objetivo de intentar reproducir la mucosidad y algunos componentes de las secreciones del tracto respiratorio en condiciones de cultivo *in vitro*, también se evaluó si la presencia de *P. aeruginosa* afectaba el crecimiento planctónico de *S. aureus* en el medio ASM. En este caso se determinaron las UFC/mL de cada especie únicamente después de 24h en cultivos mixtos de los pares de co-aislados (Figura 19). El medio utilizado fue la mezcla 1:1 de ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, y se evaluaron dos inóculos diferentes en cuanto a las proporciones de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Curiosamente, el cultivo mixto entre los co-aislados, realizado durante 24h en este medio favoreció la coexistencia entre ambas especies, y permitió el crecimiento planctónico de *S. aureus* en presencia de *P. aeruginosa* (Figura 19). Esta coexistencia se vió más favorecida cuando se inocularon 10 veces más carga bacteriana de *S. aureus* respecto a *P. aeruginosa*. Por este motivo, se decidió utilizar en los ensayos posteriores de formación de *biofilm* mixto, inóculos iniciales en la proporción 1:10 *P. aeruginosa*: *S. aureus*.



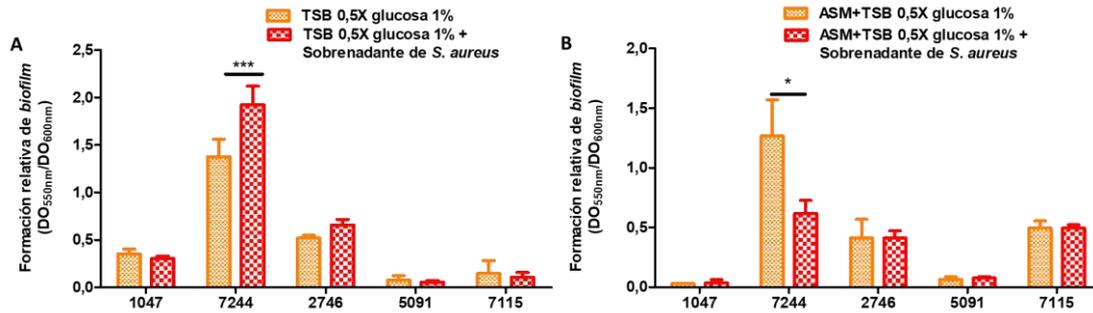
**Figura 19.** Crecimiento planctónico en cultivo mixto, realizado en la mezcla 1:1 del medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, para los pares co-aislados de *S. aureus* (SAR) y *P. aeruginosa* (PAR). A) Cultivo mixto a partir de un inóculo inicial igual para ambas especies ( $DO_{550nm}$  de 0,05); B) Cultivo mixto a partir de un inóculo inicial de *S. aureus* 10 veces mayor que *P. aeruginosa*. La tasa de crecimiento fue monitorizada mediante el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) para cada cepa a las 24h de cultivo. Los datos representan el promedio del ensayo con tres réplicas técnicas.

Posteriormente se estudió la formación de *biofilm* de cada especie del co-aislado en presencia de los exoproductos secretados por la otra especie del mismo par (*biofilms* cruzados). En general, los aislados de *S. aureus* resultaron ser mejores formadores de *biofilm* que los aislados de *P. aeruginosa* cuando cada especie fue estudiada sin interferencias debido al sobrenadante de la otra. Sin embargo, utilizando las condiciones del ensayo de formación de *biofilm* cruzado, se observó que cuatro de los cinco co-aislados de *S. aureus* mostraron una disminución significativa en la formación de *biofilm* en presencia del sobrenadante de *P. aeruginosa*. Además, en el caso del par clínico 5091, la presencia del sobrenadante de *P. aeruginosa* inhibió totalmente el crecimiento de *S. aureus* bajo esta condición de cultivo. (Figura 20).



**Figura 20.** Formación de *biofilm* relativa por *S. aureus* en presencia o ausencia del sobrenadante de *P. aeruginosa* (diluido 1:10) de su par co-aislado. Las condiciones de cultivo son: TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% (A) y una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% (B). Las barras representan la formación de *biofilm* relativa ( $DO_{550nm} CV/DO_{600nm}$  cultivo) en las placas de microdilución y las líneas de error la desviación estándar de dos réplicas biológicas con 12 réplicas técnicas por condición. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  por la prueba t-test no pareada.

Se conoce que la actividad proteasa elevada del sobrenadante de *P. aeruginosa* es capaz tanto de inhibir la formación de *biofilm* de *S. aureus* como favorecer la dispersión del *biofilm* preexistente (259), y esto podría estar relacionado con los resultados observados. Por otro lado, la presencia del sobrenadante de *S. aureus* influenció la formación de *biofilm* de *P. aeruginosa* en el par clínico 7244 (Figura 21).



**Figura 21.** Formación de *biofilm* relativa por *P. aeruginosa* en presencia o ausencia del sobrenadante de *S. aureus* (diluido 1:10) de su par co-aislado. Las condiciones de cultivo son: TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% (A) y una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% (B). Las barras representan la formación de *biofilm* relativo (DO<sub>550nm</sub> CV/DO<sub>600nm</sub> cultivo) en las placas de microdilución y las líneas de error la desviación estándar de dos réplicas biológicas con 12 réplicas técnicas por condición. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  por la prueba t-test no pareada.

### 5.3.1.3 Estudio de la estructura de los *biofilms* formados por las cepas co-aisladas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Los *biofilms* formados tanto en los dispositivos médicos como en los ambientes naturales son con frecuencia de naturaleza polimicrobiana. Por tanto, en base a los resultados obtenidos de la influencia del sobrenadante de una especie en la formación de *biofilm* de la otra, se decidió investigar, mediante microscopía de escaneo láser confocal, la arquitectura del *biofilm* simple y mixto formados por los co-aislados clínicos de ambos microorganismos, esta vez crecidos en un sistema estático. Se utilizaron los mismos medios de cultivos y una proporción de las dos especies en el inóculo inicial de 1:10 *P. aeruginosa*: *S. aureus*. Imágenes de microscopía representativas de los *biofilms* obtenidos con estas condiciones se muestran en las figuras 22 y 23.

Pese a que se observaron diferencias en la formación de *biofilm* entre los cinco pares de co-aislados clínicos y en cuanto al tipo de medio de cultivo utilizado, en general los resultados obtenidos se correlacionaron con los datos obtenidos anteriormente en los ensayos de crecimiento planctónico y *biofilm* cruzado. Por ejemplo, los resultados observados en el par 7244, en que tanto la presencia de *P. aeruginosa* en cultivo mixto (Figuras 18 y 19) como de su sobrenadante afectó significativamente la formación de *biofilm* del correspondiente co-aislado de *S. aureus* (Figura 20), se ve reflejada en las imágenes de microscopía confocal representadas en las figuras 22 y 23. En los dos medios de cultivo utilizados, el aislado SAR 7244 formó un *biofilm* simple robusto. Sin embargo, la presencia de *P. aeruginosa* (células teñidas de color verde) afectó a *S. aureus* (células teñidas de color rojo) en la condición de formación de *biofilm* mixto.

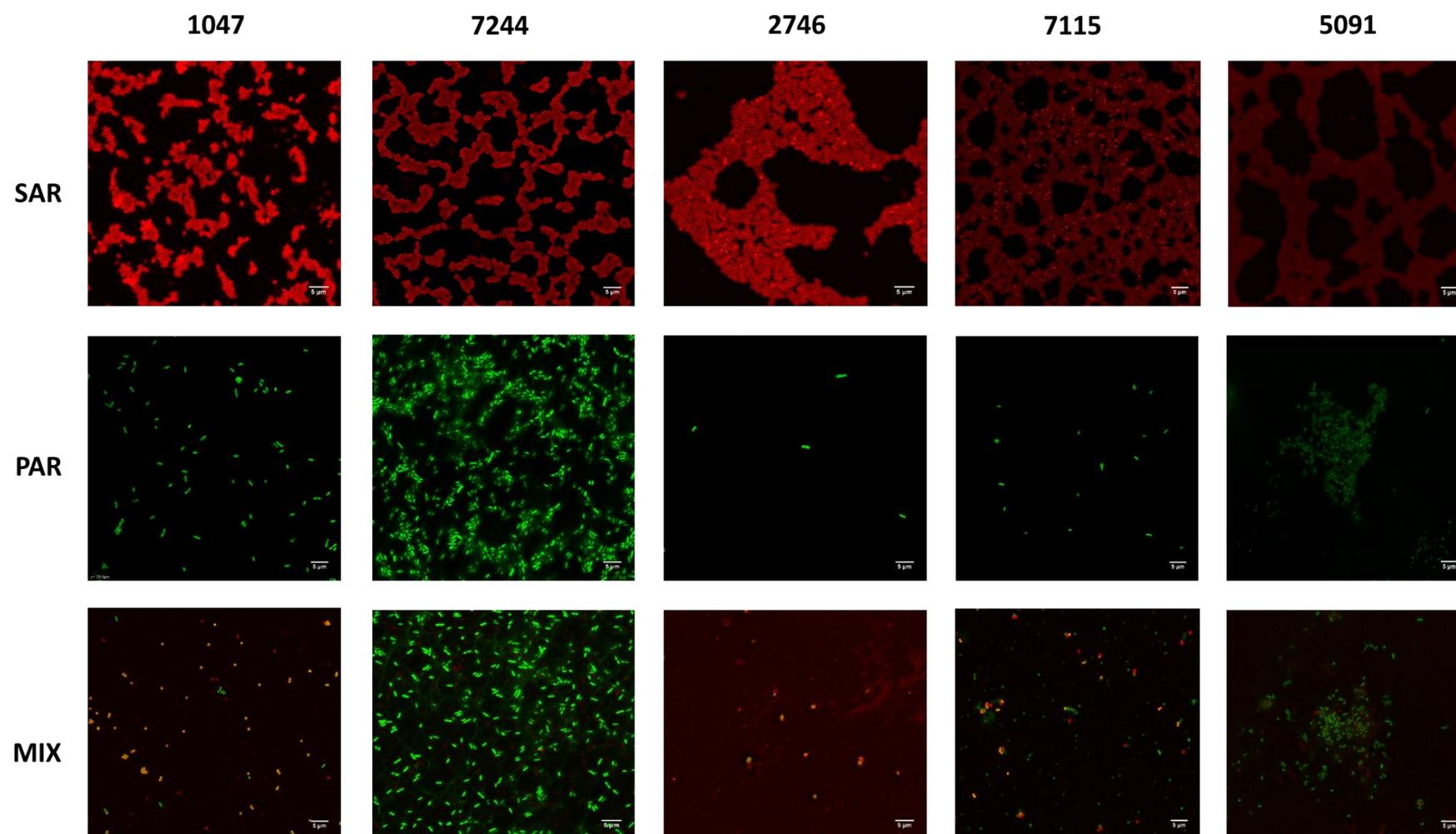
No obstante, la mayoría de los aislados en cultivo puro (*biofilm* simple) fueron capaces de establecer una adhesión inicial en ambos medios de cultivo utilizados. Por otro lado, en lo que respecta al cultivo de *biofilm* mixto, así como se observó anteriormente, el uso

de la mezcla entre los medios de cultivo ASM y TSB favoreció la coexistencia entre las dos especies.

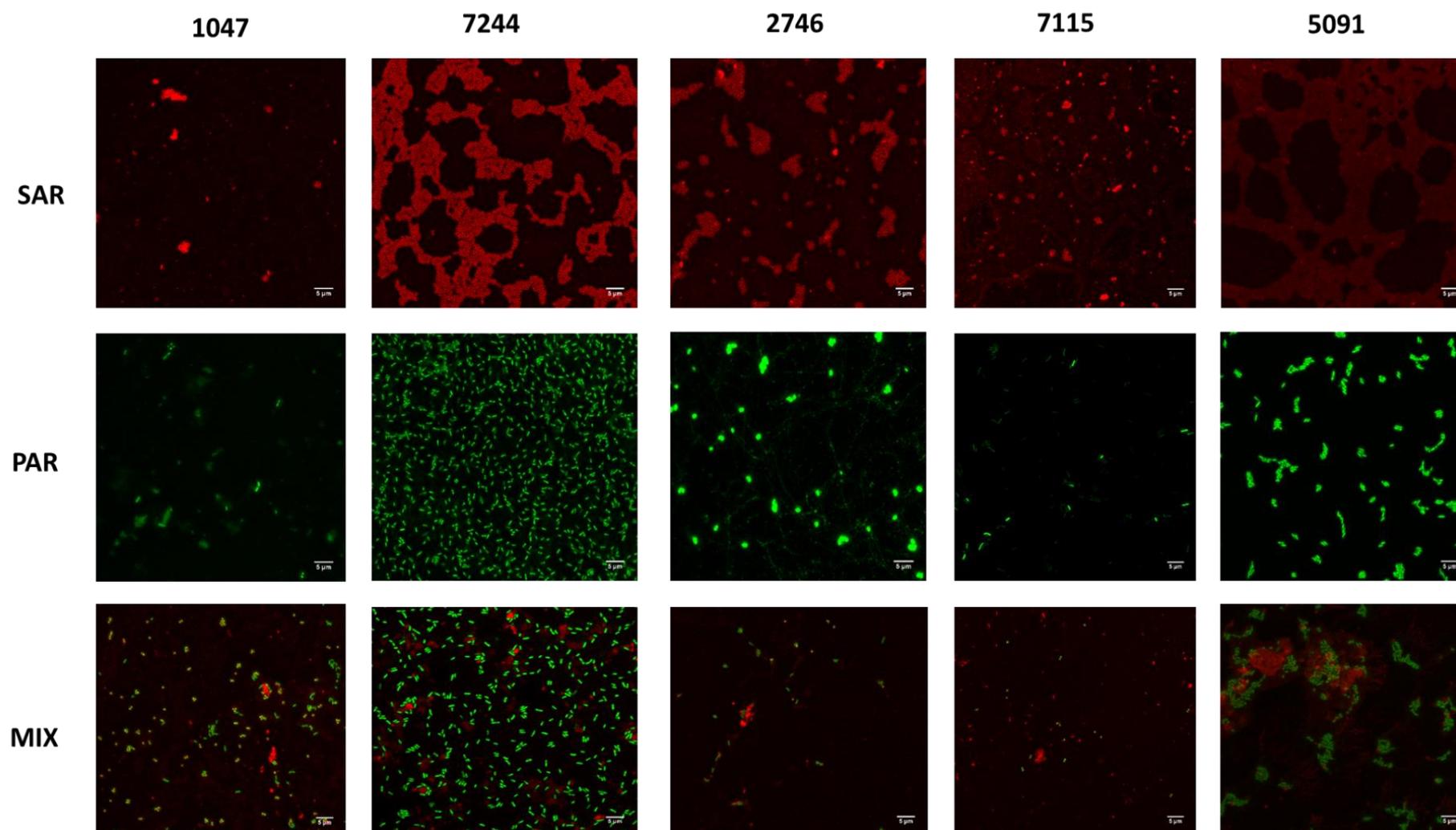
A pesar de que en las imágenes obtenidas en microscopía confocal, no se observó la formación de *biofilms* de aspecto robusto o consistente, conviene considerar que no siempre estos están formados por cientos de miles de células unidas a una superficie y embebidas en una matriz. Existen también *biofilms* que pueden contener pocas decenas de células dispuestas simplemente como un pequeño grupo o agregado (260). Además, estos *biofilms* se obtuvieron en condiciones de cultivos estáticos donde la aireación y la disponibilidad de nutrientes están limitadas. Por tanto, en muchos casos podríamos haber observado *biofilms* en las primeras etapas de formación.

Se observó también que con el medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, un medio de cultivo apropiado para la formación de *biofilms* por microorganismos Gram positivos con concentración baja de G+C (198), los co-aislados de *S. aureus* en cultivos puros formaron un *biofilm* más robustos que en la mezcla (1:1) con el medio ASM (Figura 22). Por otro lado, dado que las cepas de *P. aeruginosa* no eran buenas formadoras de *biofilm*, en lo que respecta a los *biofilms* simples o de cultivos puros, únicamente el aislado PAR 7244 mostró un *biofilm* robusto, en ambas condiciones de cultivo (Figura 22 y 23).

Los resultados obtenidos en la formación de *biofilm* mixto, así como en el crecimiento planctónico mixto, muestran que la presencia del medio ASM favoreció la coexistencia entre ambas especies, como se puede observar en los *biofilms* formados por los co-aislados 1047 y 7244 (Figura 23). Parece ser que los sistemas experimentales que simulan las condiciones fisiológicas del entorno ambiental, a través del uso de medios de cultivos de elevada complejidad química y viscosidad, favorecen una mayor biodiversidad, que en este caso se queda reflejada en la co-existencia entre estos microorganismos en condiciones *in vitro* (260, 261).



**Figura 22.** Imágenes representativas del *biofilm* simple y mixto (MIX) formado por las cepas clínicas co-aisladas de *S. aureus* (SAR) y *P. aeruginosa* (PAR) en medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, visualizadas a través de microscopía láser confocal. *P. aeruginosa* fue visualizada a través de la tinción con SYTOX Green en cuanto que *S. aureus* a través de Texas Red-X-WGA. Las barras en cada imagen indican 5µm.

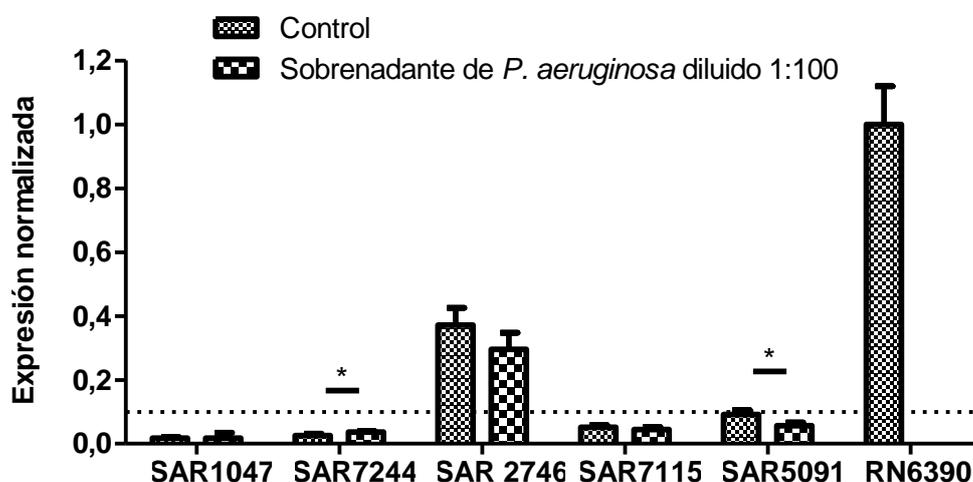


**Figura 23.** Imágenes representativas del *biofilm* simple y mixto (MIX) formado por las cepas clínicas co-aisladas de *S. aureus* (SAR) y *P. aeruginosa* (PAR) en una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, visualizadas por microscopía láser confocal. *P. aeruginosa* fue visualizada a través de la tinción con SYTOX Green en cuanto que *S. aureus* a través de Texas Red-X-WGA. Las barras en cada imagen indican 5µm.

5.3.1.4 Influencia de *P. aeruginosa* sobre el sistema Agr de *S. aureus*

Dado que la patogenicidad suele ser un proceso multifactorial, y que los sistemas de QS, a través de los genes reguladores, tienen un papel fundamental en el control global de la virulencia, es importante estudiar de qué manera las moléculas señal producidas por un microorganismo influyen en el otro microorganismo en cuanto a las relaciones interespecies. En este contexto, se evaluó primeramente el impacto del sobrenadante de *P. aeruginosa* sobre la funcionalidad del sistema Agr de la cepa correspondiente de *S. aureus* co-aislada crecida en medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%.

Considerando que de entre los cinco aislados clínicos de *S. aureus* analizados, únicamente SAR 2746 y SAR 5091 tenían el sistema Agr funcional, la presencia del sobrenadante del co-aislado correspondiente de *P. aeruginosa* influyó disminuyendo significativamente los niveles de expresión de *rnalll* únicamente en SAR 5091 ( $p=0,0274$ ). Por otro lado, se observó un aumento en la expresión observada por el aislado SAR 7244 en presencia del sobrenadante de la cepa co-aislada de *P. aeruginosa* ( $p=0,048$ ). Sin embargo, únicamente el sistema Agr del aislado SAR 5091 cambió su estado de funcional a disfuncional bajo estas condiciones de cultivo (Figura 24).



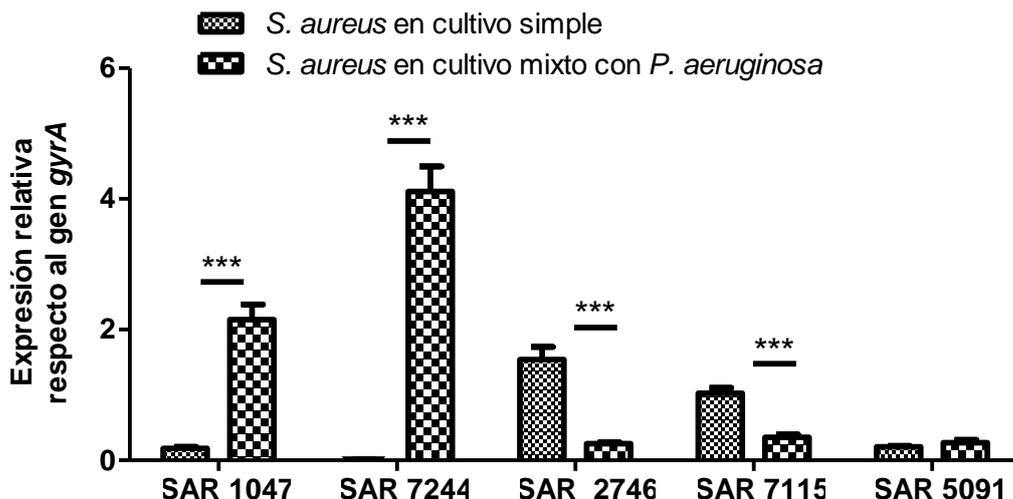
**Figura 24.** Niveles de expresión del gen *rnalll* en los aislados de *S. aureus* (SAR) en presencia y ausencia del sobrenadante del correspondiente co-aislado de *P. aeruginosa*. El sobrenadante fue diluido 1:100 y el medio de cultivo TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%. El eje Y muestra la expresión normalizada respecto al gen *gyrA* y relativa respecto a la cepa de *S. aureus* control positivo del sistema Agr (RN6390). La línea punteada indica el punto de corte (0,1) utilizado para discriminar las cepas con el sistema Agr funcional y disfuncional. El aislamiento cuyo el nivel de expresión resultó 10 veces menor que el valor del control positivo fue considerado como Agr disfuncional; \*  $p < 0,05$  por la prueba t-test no pareada.

En un estudio realizado previamente (170), los autores mostraron que las AHLs, producidas por *P. aeruginosa* y presentes en el sobrenadante, especialmente las de cadena acilo larga, como la 3-oxo-C12-AHL, y en concentraciones por debajo de la inhibición del crecimiento, reducían de manera significativa la expresión del sistema Agr y de algunos de los genes regulados por él.

En este sentido, cabe destacar que todos los co- aislados de *P. aeruginosa* analizados en nuestro estudio resultaron ser productores de AHLs de cadena acilo larga, visto que el método utilizado para detectar la producción de AHL, mediante la cepa biosensora *A. tumefaciens* KC55, solo es capaz de detectar estas AHLs en concreto (203). No obstante, parece ser que la presencia y/o concentración de estas AHLs en el sobrenadante del aislado de *P. aeruginosa* PAR 2746 no fue capaz de influenciar la funcionalidad del sistema Agr de su correspondiente co- aislado de *S. aureus*, ya que la disminución de los niveles de expresión que se observó en este caso, clasificado como Agr funcional, no fue estadísticamente significativa.

Sin embargo, hay que mencionar como una limitación del estudio, que el método utilizado para detectar la producción de AHL, en la presente tesis, no es capaz de discriminar, ni tampoco cuantificar los diferentes tipos de AHL de cadena acilo larga presentes en el sobrenadante de *P. aeruginosa*. Parece ser que tanto el tipo de AHL como su concentración en el sobrenadante son variables importantes para determinar el antagonismo de *P. aeruginosa* sobre el sistema Agr de *S. aureus* (170).

En segundo lugar, se evaluaron los niveles de expresión de *rnalIII* para los aislados clínicos de *S. aureus* en cultivo simple y mixto, con el correspondiente co-aislado de *P. aeruginosa*, realizado en la mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%. Los resultados obtenidos demostraron que en dos de los aislados de *S. aureus*, SAR 1047 y SAR 7244, la presencia de su correspondiente co-aislado de *P. aeruginosa*, favoreció de manera significativa el aumento de los niveles de expresión de *rnalIII*. Sin embargo, el aislado SAR 2746, cuyo sistema Agr resultó funcional en las condiciones de cultivo analizadas anteriormente con TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% (Figura 24), presentó una disminución significativa en la expresión de *rnalIII* en cultivo mixto con su correspondiente co-aislado de *P. aeruginosa* (Figura 25). Por último, en el aislado SAR 7115 también hubo una reducción significativa de los niveles de expresión de *rnalIII*. Según este experimento, los resultados observados podrían representar un cambio en cuanto al estado de la funcionalidad del sistema Agr de estos aislados, lo cual podría tener implicaciones en la clínica.



**Figura 25.** Niveles relativos de expresión del gen *rnaIII* en los aislados de *S. aureus* (SAR) en cultivo simple y mixto con su correspondiente co-aislado de *P. aeruginosa*, en una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% durante 24h. Expresión relativa normalizada respecto al gen constitutivo *gyrA*; \*\*\*  $p < 0,001$  por la prueba t-test no pareada.

#### 5.3.1.5 Influencia de *S. aureus* sobre el sistema QS- *pqs* de *P. aeruginosa*

Como descrito anteriormente, entre los diferentes sistemas QS presentes en *P. aeruginosa*, mencionados en la introducción, el que parece tener una implicación importante en las relaciones interespecies con organismos Gram positivos, como *S. aureus*, es el QS-*pqs* (164). Este sistema QS, entre otras funciones metabólicas y reguladoras de virulencia, también es responsable por producir moléculas de efecto anti estafilocócico, como el HQNO, conocida por contribuir en la competencia ambiental entre ambas especies debido a su actividad inhibidora de la respiración oxidativa (166). Debido a esto, se decidió estudiar la expresión del gen responsable de la producción de HQNO, el *pqsL*, en los aislados de *P. aeruginosa*, en cultivo mixto con su co-aislado clínico de *S. aureus*.

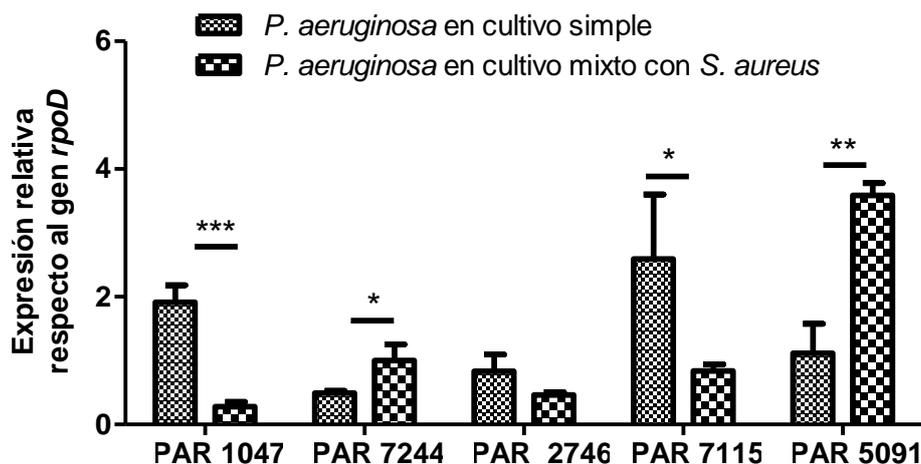
En primer lugar, se evaluó la expresión del gen en cultivos simples realizados en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% (no se muestra). Los resultados obtenidos mostraron que, utilizando este medio de cultivo, los aislados clínicos de *P. aeruginosa* no expresaban el gen *pqsL*. Probablemente la expresión de este gen está reprimida en estas condiciones. No obstante, la cepa referencia de *P. aeruginosa* PAO1, crecida bajo las mismas condiciones, mostró niveles de expresión elevados para este gen, lo que está de acuerdo con otros estudios publicados (175, 262).

A continuación, se estudió la expresión del gen *pqsL* en cultivos simples y mixtos en una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%. Los resultados mostraron que la presencia del medio ASM, a diferencia del TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, favoreció la expresión del gen *pqsL*. No obstante, en la condición de cultivo

mixto con *S. aureus*, los co-aislados PAR 1047 y 7115 presentaron una disminución significativa en los niveles de expresión relativa de este gen, mientras que los aislados PAR 7244 y 5091 presentaron un aumento significativo con respecto a la expresión en condiciones de cultivos simples (Figura 26).

En la literatura se ha descrito ampliamente el efecto anti estafilocócico de la molécula HQNO de *P. aeruginosa*, producida por el gen *pqsL* (164, 175). Sin embargo, hay estudios que también demuestran que la presencia de HQNO induce la formación de *biofilm* y del fenotipo SCV en cepas de *S. aureus* (262).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en cuanto a la formación de *biofilm* mixto de los pares de co-aislados clínicos 7244 y 5091 en presencia de ASM, donde se observa una presencia mayor de *S. aureus*, cuando se compara con el medio de cultivo TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% (Figura 23), podrían estar relacionados con los niveles de expresión del gen *pqsL*, y la consecuente producción de HQNO, observado en los aislados PAR 7244 y PAR 5091 (Figura 26).



**Figura 26.** Niveles de expresión relativa del gen *pqsL* en los aislados de *P. aeruginosa* (PAR) en cultivo simple y mixto con su correspondiente co-aislado de *P. aeruginosa*, en una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% durante 24h. Expresión relativa normalizada respecto al gen constitutivo *rpoD*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  por la prueba t-test no pareada.

El conjunto de resultados demuestra que la influencia de una especie sobre la otra depende significativamente del fondo genético de las cepas que se encuentran formando parte del mismo nicho ecológico. Además, cabe destacar que los resultados obtenidos en nuestro estudio son muy difíciles de comparar con otros disponibles en la literatura. Por un lado, está ya la mencionada diversidad genética y fenotípica de estos aislados, donde se añade a esto la procedencia de los mismos (pacientes con sospecha

de ITRI aguda). Por otro lado, está la situación de que a menudo los estudios realizados y que están disponibles en la literatura utilizan cepas bacterianas de referencia y de laboratorio, que pueden no exhibir el mismo fenotipo que las cepas clínicas, o aislados clínicos provenientes de pacientes con infecciones respiratorias crónicas, cuyo contexto clínico/médico es muy distinto.

### **5.3.2 Caracterización de las cepas clínicas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* aisladas consecutivamente de pacientes con ITRI.**

#### **5.3.2.1 Interacciones entre *S. aureus* y *P. aeruginosa* en la formación de *biofilm* estático y en flujo continuo.**

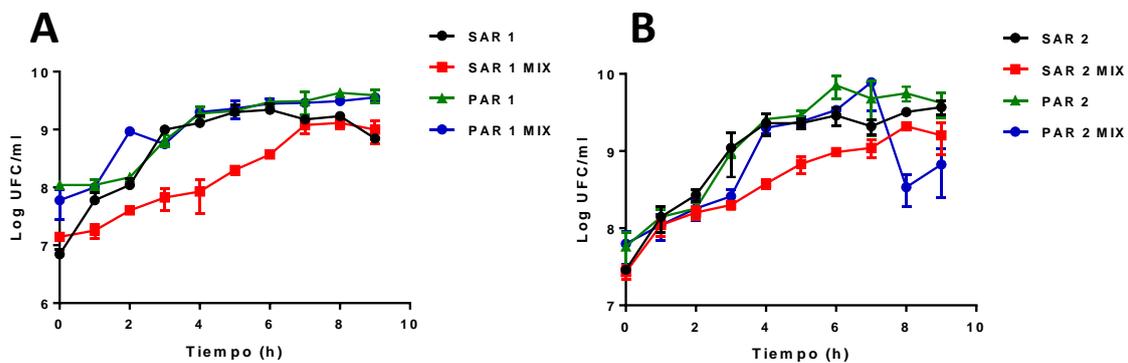
Uno de los resultados que se obtuvo en el objetivo 1 fue que los casos clasificados como *S. aureus* persistentes en muestra respiratoria mostraban en mayor frecuencia un aislamiento posterior por *P. aeruginosa*. A raíz de ello se decidió investigar si la presencia de *S. aureus* influía en la colonización y/o infección posterior de *P. aeruginosa*, mediante el estudio de la formación de *biofilm* tanto estático como en flujo continuo. Los *biofilms* en cámaras de flujo continuo, además de permitir la investigación microscópica a tiempo real, se desarrollan bajo condiciones hidrodinámicas que pueden ser cuidadosamente modificadas y controladas, a diferencia de los ensayos estáticos *in vitro*.

Como mencionado anteriormente en el apartado cepas de estudio, los casos clínicos (1 y 2) evaluados en este estudio fueron obtenidos de dos pacientes con ITRI. El aislado de *S. aureus* del caso clínico 2 (SAR 2) representaba la condición de aislamiento persistente de *S. aureus* (siete días de persistencia), mientras que el aislado del caso clínico 1 (SAR 1) fue clasificado como no persistente, según los criterios definidos anteriormente. Los dos aislados de *S. aureus* eran MSSA y tenían el Agr funcional.

Por otro lado, en el contexto de una colaboración con la Universidad de Umea, Suecia, se caracterizaron fenotípicamente, respecto a la pigmentación de las colonias, hidrofobicidad superficial y motilidad, un conjunto de aislados clínicos de *P. aeruginosa*, entre ellos los aislados PAR 1 y PAR 2, que son objeto de estudio en la tesis. Los resultados obtenidos mostraron que ambos aislados presentaron colonias no pigmentadas (color blanco) y una hidrofobicidad superficial baja. Sin embargo, pese a que los resultados obtenidos en la evaluación de la motilidad del tipo *swimming* y *twitching* fueron similares, se observaron diferencias en cuanto a la motilidad del tipo *swarming*, casi inexistente en el aislado clínico PAR 2. Finalmente, en cuanto a la susceptibilidad antibiótica, ambos aislados resultaron resistentes a múltiples fármacos.

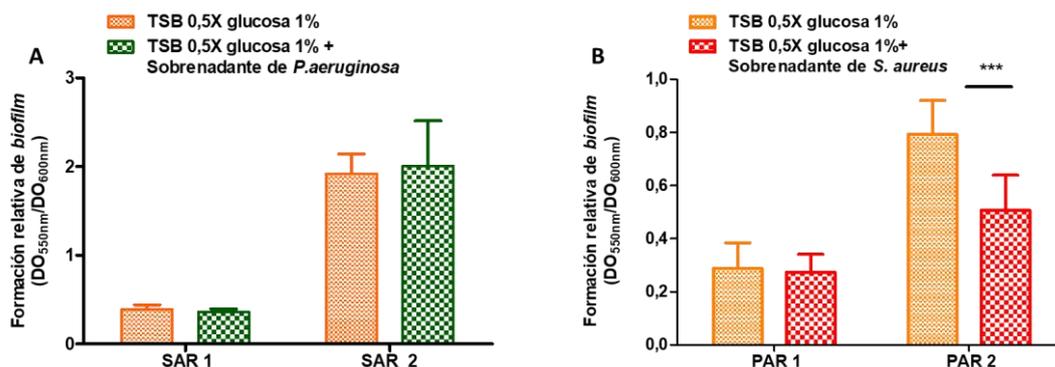
Antes de caracterizar la formación de *biofilm* en estos pares, estudiamos las interferencias de una especie sobre la otra en cultivos mixtos. En cuanto al crecimiento planctónico observado en el caso clínico 1, el aislado SAR 1 tuvo su dinámica afectada en

las primeras seis horas de cultivo mixto. Por otro lado, el aislado SAR 2 también presentó una inhibición en el crecimiento, aunque menor que la observada en el caso clínico 1 (Figura 27). No obstante, no se observó el resultado esperado de superación y/o eliminación de *S. aureus* por parte de *P. aeruginosa*, cuando se utiliza un medio de cultivo estándar como el TSB. Parece ser que, en estos casos de aislados clínicos, así como se ha descrito en estudios anteriores (255), *S. aureus* podría haber utilizado estrategias para sobrevivir en presencia de *P. aeruginosa*. En diversas enfermedades, como la FQ y las infecciones relacionadas con los dispositivos médicos, la coinfección con *P. aeruginosa* conduce a *S. aureus* al desarrollo de SCV (247), un fenotipo bien caracterizado y descrito por su sorprendente capacidad de supervivencia en condiciones desfavorables (98). Además, en el resultado obtenido con el caso clínico 2, curiosamente se observa una inhibición en el crecimiento por parte del aislado de *P. aeruginosa* PAR 2 cuando se compara con el crecimiento en cultivo simple (Figura 27).



**Figura 27.** Dinámica de crecimiento de los pares clínicos de *S. aureus* (SAR) y *P. aeruginosa* (PAR) aislados consecutivamente. A) caso clínico 1; B) caso clínico 2. Crecimiento planctónico en cultivo individual (SAR y PAR) y mixto (SAR mix y PAR mix) en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% durante 10h. La tasa de crecimiento fue monitorizada mediante el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Los datos representan el promedio del ensayo con tres réplicas técnicas.

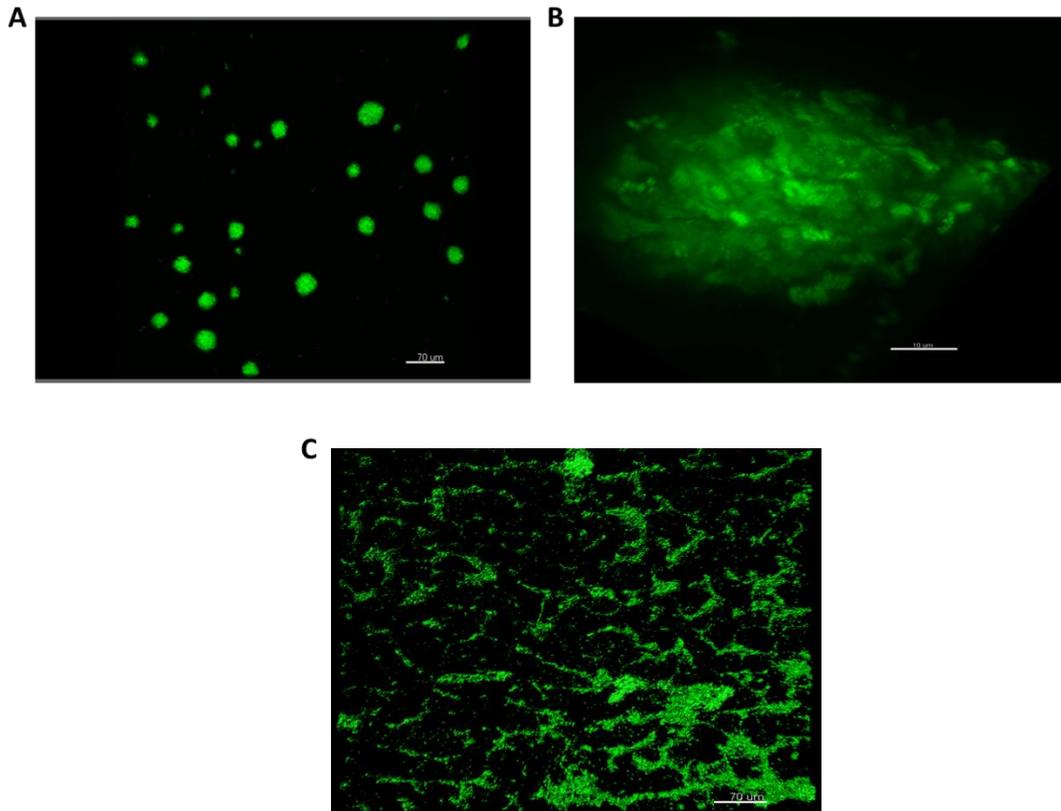
En cuanto la formación de *biofilm* estático, los aislados del caso clínico 2 desarrollaron mejor *biofilm* que los del caso 1 en el medio TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, aunque en general, en las condiciones analizadas, ninguno de los aislados evaluados resultaron ser formadores de un *biofilm* robusto (Figura 28). Estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que ambos aislados tenían una superficie celular poco hidrofóbica. En el ensayo de *biofilm* cruzado, no se observó que el sobrenadante de *P. aeruginosa* tuviese ninguna influencia en la formación de *biofilm* de *S. aureus* (Figura 28A). Por otro lado, el aislado de *P. aeruginosa* PAR 2 presentó una reducción significativa en la formación de *biofilm* en la presencia del sobrenadante de *S. aureus* correspondiente (Figura 28B).



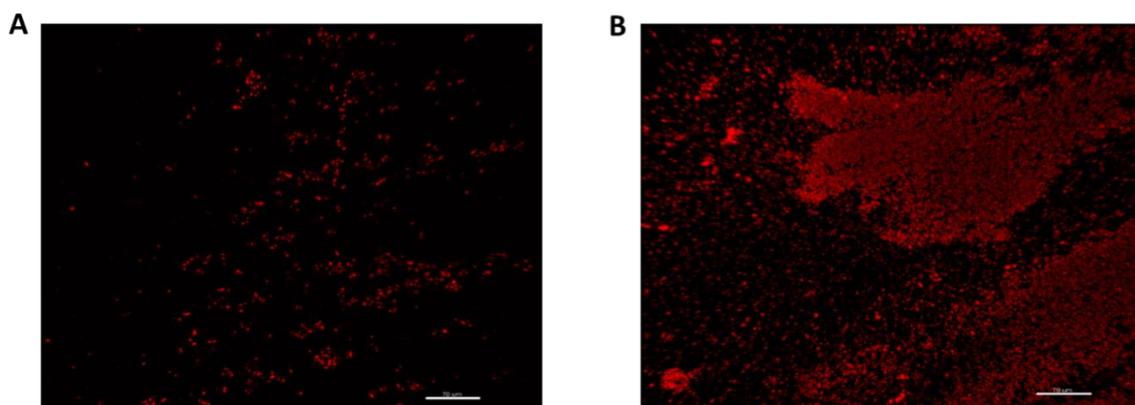
**Figura 28.** Formación de *biofilm* “cruzado” por los pares clínicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa* aislados consecutivamente 1 y 2. A) Formación de *biofilm* de *S. aureus* en presencia del sobrenadante de *P. aeruginosa*, diluido 1:10 en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%. B) Formación de *biofilm* de *P. aeruginosa* en presencia del sobrenadante de *S. aureus*, diluido 1:10 en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%. Las barras representan la formación de *biofilm* relativo (DO<sub>550nm</sub> CV/DO<sub>600nm</sub> cultivo) en las placas de microdilución y las líneas de error la desviación estándar de dos réplicas biológicas con 12 réplicas técnicas por condición; \*\*\*  $p < 0,001$  por la prueba t-test no pareada.

A continuación, se evaluó la formación de *biofilm* simple en flujo continuo sobre superficie de vidrio, y se observaron diferencias inter- e intra-especies, en cuanto a la arquitectura de estos *biofilms*. En relación a los aislados de *P. aeruginosa*, PAR 1 en cultivo puro formó un *biofilm* simple irregular, de aspecto “granulado”, a modo de microcolonias de células que se encontraban distribuidas por la superficie de vidrio (Figura 29 A-B). A su vez, PAR 2 formó una capa de *biofilm* fina extendida por la superficie (Figura 29C). Esta diferencia en la morfología de los *biofilms* podría estar relacionada con las características fenotípicas de estos aislados, como por ejemplo la motilidad superficial o la producción de diferentes EPS (164). El tipo de textura del *biofilm* formado por el aislado PAR 1 podría explicarse debido a una motilidad superficial reducida, ya que no realizaba *swarming* en las condiciones evaluadas previamente.

Por otro lado, los aislados de *S. aureus* en cultivo puro desarrollaron un *biofilm* simple de aspecto más uniforme, que se encontraba esparcido por la superficie del vidrio. Como era de esperar, teniendo en cuenta los resultados de la formación de *biofilm* estático en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%, SAR 2 formó un *biofilm* más robusto y consistente que el formado por el aislado SAR 1 (Figura 30).



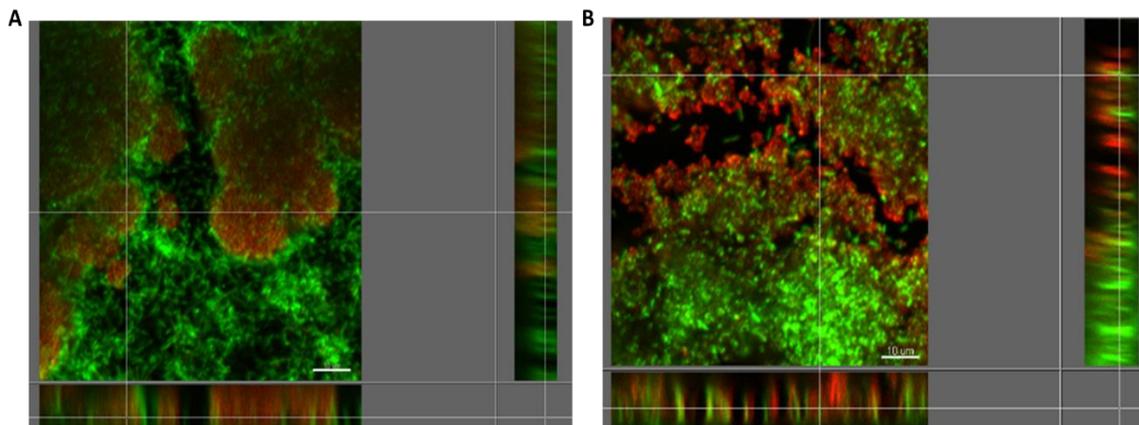
**Figura 29.** Imágenes representativas de la arquitectura del *biofilm* simple formado por cultivo puro de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* (PAR 1 y PAR 2) después de 48h de incubación en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% en flujo continuo, a través de microscopía láser confocal. Imágenes procesadas por el programa Imaris. A y B) *Biofilm* de aspecto “granulado” formado por el aislado PAR 1; Las barras indican 70 y 10  $\mu\text{m}$ , respectivamente. C) *Biofilm* formado por el aislado PAR 2; La barra indica 70  $\mu\text{m}$ . *P. aeruginosa* fue visualizada a través de la tinción con SYTOX Green.



**Figura 30.** Imágenes representativas de la arquitectura del *biofilm* simple formado por cultivos puros de los aislados clínicos de *S. aureus* (SAR 1 y SAR 2) después de 48h de incubación en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% en flujo continuo, a través de microscopía láser confocal. Imágenes procesadas por el programa Imaris. A) *Biofilm* formado por el aislado SAR1. B) *Biofilm* formado por el aislado SAR 2. Las barras indican 70  $\mu\text{m}$ . *S. aureus* fue visualizado a través de la tinción con Texas Red-X-WGA.

Caracterizados los *biofilms* simples, formados a partir de cultivos puros de una única especie, se procedió al análisis de los *biofilms* mixtos, formado por las dos especies de cada caso clínico. Es conocido que en las infecciones de naturaleza polimicrobiana, las interacciones entre los microorganismos pueden ocurrir a diferentes tiempos. Los microorganismos pueden aparecer simultáneamente dentro del hospedador, o gradualmente como una sucesión de adquisiciones de patógenos (260). En este contexto, se decidió estudiar finalmente cómo sería la interacción entre estos aislados clínicos, en lo que respecta a la formación de *biofilm* en flujo continuo, en una situación donde inicialmente estaría el inóculo de *S. aureus* en la cámara de flujo durante dos horas, seguido posteriormente de la inoculación de *P. aeruginosa*. De este modo se simuló la formación de *biofilm* por *P. aeruginosa* sobre un *biofilm* de *S. aureus* primario o en las primeras etapas de maduración.

Por tanto, en cuanto a la microbiogeografía (organización espacial de las poblaciones bacterianas) (260), los resultados obtenidos en los *biofilms* polimicrobianos, de los dos pares clínicos analizados, mostraron una asociación cercana de las dos especies en forma de microcolonias mixtas (Figura 31). En el *biofilm* mixto formado por el caso clínico 1 (Figura 31A), se observó además de la asociación entre ambas especies, una capa de *biofilm* mono-especie formada por el aislado de *P. aeruginosa* PAR 1 que recubría la superficie del vidrio. En el caso clínico 2, la interacción entre los aislados se veía reflejada en forma de co-agregados bacterianos distribuidos por la superficie del vidrio, donde además se observó una cierta tendencia a la formación de *biofilm* por parte de PAR 2 en el interior del *biofilm* formado por SAR 2.



**Figura 31.** Imágenes representativas de la arquitectura del *biofilm* mixto formado por los pares clínicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa* aislados consecutivamente 1 y 2, después de 48h de incubación en TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% en flujo continuo, a través de microscopía láser confocal. Los *biofilms* se formaron a partir del inóculo inicial de *S. aureus* en la cámara de flujo durante dos horas, seguido posteriormente de la inoculación de *P. aeruginosa*. A) *Biofilm* formado por el caso clínico 1; B) *Biofilm* formado por el caso clínico 2. *P. aeruginosa* fue visualizada a través de la tinción con SYTOX Green en cuanto que *S. aureus* a través de Texas Red-X-WGA. La imagen central muestra la fluorescencia de las proyecciones obtenidas de arriba y abajo, mientras que las imágenes laterales muestran las secciones verticales (Software Imaris). Las barras en cada imagen indican 10  $\mu\text{m}$ .

Un estudio reciente (263) ha demostrado que los EPS influyen en la microbiogeografía y la integración de *P. aeruginosa* en *biofilm* mixto con *S. aureus*. Parece ser que las bacterias pueden usar polímeros extracelulares específicos para modular las propiedades físicas de su microambiente, y esto a su vez afecta la estructura del *biofilm*, la diferenciación y las interacciones entre especies.

*P. aeruginosa* produce tres tipos de EPS (alginato, Pel y Psl) que forman la matriz extracelular del *biofilm* y tienen una función estructural y protectora. Pel y Psl son los principales EPS producidos por las cepas no mucoides como las que fueron analizadas en este estudio. Parece ser que las cepas de *P. aeruginosa* Pel positivas forman una matriz que permite que *S. aureus* se infiltre en el *biofilm*, favoreciendo así la formación de *biofilm* mixto entre estas especies. Por otro lado, la función de Psl en la formación de *biofilm* mixto no está tan definida (263).

Otro aspecto importante que se debe considerar en cuanto al rol funcional de los EPS durante la formación de *biofilm* polimicrobiano, es que su producción en cantidades mínimas, ya sea del tipo Pel o Psl, propicia a las especies que componen el *biofilm mixto*, incluso a las cepas o especies no productoras, a un aumento en la protección contra los antibióticos (164). En este estudio no se realizó la caracterización fenotípica y genotípica de los aislados clínicos de *P. aeruginosa*, en cuanto a la producción de EPS, lo que puede ser considerado un factor limitante del análisis de la arquitectura de los *biofilms* mixtos obtenidos.

Por otro lado, los resultados obtenidos con estos pares de aislados clínicos están de acuerdo con otros disponibles en la literatura (164), donde se sugiere que si en determinadas condiciones *in vitro*, *S. aureus* es capaz de sobrevivir a la competencia o superación por *P. aeruginosa*, ambos microorganismos pueden coexistir y formar *biofilm* mixto. En este caso, *S. aureus* se beneficiaría de la barrera antimicrobiana proporcionada por los diferentes fenotipos de virulencia de *P. aeruginosa* relacionado con sus diferentes sistemas QS.

## DISCUSIÓN GENERAL

---

*S. aureus* es una bacteria comensal que en determinadas condiciones puede actuar como un patógeno oportunista intracelular facultativo (88). Este microorganismo dispone de un conjunto de factores de virulencia complejo, cuyas implicaciones están bien definidas en la gravedad de las infecciones adquiridas en la comunidad, pero menos en las de origen nosocomial. Los sistemas reguladores, como el Agr (*accessory gene regulator*) controlan la virulencia de *S. aureus* interviniendo en la transición del estado comensal al de patógeno (108).

Por todo ello, *S. aureus* está altamente adaptado a las presiones selectivas impuestas por la inmunidad del hospedador (264). Esta capacidad adaptativa del microorganismo en el ambiente de las vías respiratorias inferiores (204) dificulta establecer el valor clínico de su aislamiento en determinados grupos de pacientes (14). Por otro lado, debido a la gravedad de la complicación a causa de neumonía y a la evidencia de que el tratamiento antibiótico temprano es crucial, la conducta habitual es comenzar precozmente con un tratamiento antibiótico empírico basado en la sospecha clínica. Sin embargo, este criterio conlleva el riesgo de utilizar los antibióticos de forma excesiva e innecesaria, e incrementa el riesgo de la aparición de multirresistencias. Por lo tanto, identificar los factores clínicos y microbiológicos que podrían estar asociados con el desarrollo y progresión de la infección respiratoria causada por *S. aureus*, tendría implicaciones directas en el diagnóstico, facilitando la distinción entre los estadios de colonización e infección, además de representar un cambio significativo en el manejo de estas infecciones, en lo que respecta a la prescripción adecuada del tratamiento antibiótico. Sobre esta hipótesis inicial, y basándonos en los resultados de este trabajo, discutiremos de manera integradora como algunos factores sobre todo bacterianos podrían influir en el curso de una infección respiratoria por *S. aureus*.

En el presente trabajo, primeramente, se evaluó en una cohorte de pacientes sometidos a VM, y que fueron clasificados en diferentes grupos de estudio (infección vs colonización bronquial), qué factores del microorganismo y del hospedador estarían relacionados con la evolución clínica y el aislamiento persistente de *S. aureus* en muestra respiratoria, a pesar de recibir tratamiento ajustado al perfil de susceptibilidad antibiótica.

Entre las diferentes variables evaluadas, se observó que la evolución clínica desfavorable relacionada con el proceso infeccioso fue más frecuente en los pacientes clasificados como neumonía, a pesar de la falta de definiciones consensuadas para una caracterización precisa de los grupos de estudio. Además, conviene resaltar que ni el perfil de resistencia a la metilina, como tampoco los días de VM y estancia en la UCI tuvieron una influencia en la evolución clínica de estos pacientes. Por otro lado, a pesar de la heterogeneidad (diversidad de complejos clonales) y elevada variabilidad genética (presencia/ausencia de genes de virulencia) observada en los aislados clínicos

analizados, no se encontraron asociaciones claramente significativas entre los factores del microorganismo evaluados y la evolución clínica. Sin embargo, la presencia de determinados genes que codifican factores microbianos relacionados con la adhesión celular, como la proteína de unión a fibronectina B (*fnbB*) y la proteína de unión al colágeno (*cna*) resultaron ser más frecuentes en el grupo de estudio clasificado como colonización bronquial, y su presencia se correlacionó con los días de estancia en la UCI en este grupo de pacientes. La proteína de unión a fibronectina B (FnBPB), codificada por el gen *fnbB*, es conocida principalmente por mediar la adhesión de *S. aureus* al fibrinógeno, elastina y fibronectina. Sin embargo, parece ser que determinados dominios de esta proteína permiten la unión entre las células mientras ocurre la formación de un fenotipo de *biofilm* característico de algunas cepas MRSA (265). En cuanto al gen *cna*, su presencia y actividad se asocian más con determinados tipos de infecciones, como por ejemplo la osteomielitis (266) y la queratitis ocular (212), que con las infecciones del tracto respiratorio.

Por otro lado, alrededor del 40% de los pacientes presentaron un aislamiento persistente de *S. aureus* en muestra respiratoria, a pesar del tratamiento antibiótico ajustado. Los resultados demostraron correlaciones significativas entre la persistencia y algunas de las variables clínicas, como la edad, los días de ventilación mecánica y estancia en la UCI, el valor elevado de CPIS, el aislamiento consecutivo de *P. aeruginosa* en muestra respiratoria y, finalmente, el perfil de resistencia a la cloxacilina, aunque también se observaron casos de aislados MSSA persistentes. Sin embargo, únicamente las variables edad y resistencia a la cloxacilina resultaron estadísticamente significativas en el análisis multivariable. Por otro lado, no se observó ningún resultado significativo en cuanto a la asociación entre el aislamiento persistente y la evolución clínica.

Entre los diversos procesos biológicos de *S. aureus* implicados en su patogénesis, se encuentra la actividad del sistema Agr. La activación de este sistema regulador, que se relaciona directamente con el estilo de vida adoptado por el microorganismo (planctónico o sésil y asociado en *biofilm*), induce cambios en la expresión génica celular que propician una rápida dispersión bacteriana en el hospedador (267). La dispersión de *S. aureus* requiere de un aumento en la producción de toxinas con efecto surfactante como las PSMs, o hemolíticas, como las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ - hemolisinas, siendo todas ellas expresadas habitualmente en los procesos de infección aguda (124, 228). No obstante, la activación de este sistema indirectamente disminuye la expresión de los genes responsables de la agregación y fijación celular, así como de los genes que sintetizan la matriz extracelular polisacárida, que están involucrados en el proceso de formación de *biofilm* (160). Por tanto, el sistema Agr regula de manera antagónica el modo de vida planctónico o asociado a *biofilm* de *S. aureus*, que a su vez contribuyen al desarrollo de los resultados de la infección aguda y crónica, respectivamente (267).

Por todo lo mencionado anteriormente, se considera importante determinar la funcionalidad del sistema Agr en los aislados clínicos, debido a su relevancia en la patogenicidad estafilocócica, descrita en numerosos modelos animales, y en las asociaciones observadas en determinados cuadros clínicos, como por ejemplo la bacteriemia (144). Los resultados presentados en este estudio incluyen por primera vez, según nuestro conocimiento, el análisis de la funcionalidad del sistema Agr en aislados clínicos obtenidos de pacientes con infecciones respiratorias. Aunque se observó un elevado porcentaje de aislados con el sistema Agr funcional, alrededor del 80%, no se encontraron correlaciones significativas con el resultado clínico, lo que sugiere una posible implicación de la actividad de este sistema regulador en la adaptación del microorganismo al hábitat respiratorio.

Por otro lado, en cuanto a las correlaciones entre la funcionalidad del sistema Agr y la formación de *biofilm*, cabe destacar que la mayoría de los aislados clínicos con el sistema Agr disfuncional presentaron una elevada capacidad de formación de *biofilm*. La asociación entre estas características fenotípicas de los aislados clínicos y la patogénesis estafilocócica ha sido descrita previamente en otros tipos de infecciones (268), donde además sirve como un marcador diagnóstico de la cronicidad de la infección en los huesos y tejidos de las articulaciones. Por lo tanto, teniendo en cuenta que estos aislados provinieron de pacientes intubados, una situación donde las interacciones entre la mucosa respiratoria del paciente, el tubo endotraqueal y la microbiota son favorables al desarrollo de infecciones polimicrobianas asociadas con *biofilm*, este resultado podría ser relevante.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo destacan la importancia del uso de un enfoque combinando métodos fenotípicos y genotípicos, a la hora de investigar con mayor precisión las posibles asociaciones entre los factores microbianos y el resultado clínico o la susceptibilidad a los antibióticos. Además, los factores relacionados con el tratamiento antibiótico como son la dosis, el tiempo de administración y su duración, deben ser considerados en este tipo de estudio. Estos factores pueden modificar las características genotípicas y fenotípicas del microorganismo, y por lo tanto tener un impacto importante en el resultado clínico.

A continuación, en el contexto de las interacciones entre las diferentes comunidades bacterianas que coexisten en las vías respiratorias, y de las infecciones de naturaleza polimicrobiana relacionadas con la formación de *biofilm*, se decidió investigar las relaciones interespecies entre *S. aureus* y *P. aeruginosa*, en lo que respecta al desarrollo de fenotipos de virulencia que contribuyen a la patogénesis de estos microorganismos.

Estudiar el proceso de desarrollo de células individuales dispersas a estructuras multicelulares complejas, que a su vez están formadas por diferentes poblaciones bacterianas organizadas espacialmente, y que además realizan importantes interacciones mediante diferentes sistemas de comunicación o QS, es esencial para

crear estrategias que puedan controlar o impedir la formación de *biofilm* por estos microorganismos.

Primeramente, entre los resultados obtenidos, así como la mayoría de los que están disponibles en la literatura, se observó que la relación de coexistencia entre *S. aureus* y *P. aeruginosa* se ve afectada *in vitro* en medios de cultivo estándares como los usados en este trabajo (172, 269). Esta es una cuestión importante que se debe considerar, visto que la fisiología microbiana y las comunidades polimicrobianas a menudo se estudian en condiciones de laboratorio que carecen de elementos esenciales de los entornos naturales donde los microorganismos se encuentran.

Por tanto, este trabajo enfatiza la importancia de recrear condiciones fisiológicamente relevantes para estudiar el comportamiento microbiano, y justifica el uso de medios de cultivo cuya composición simule de alguna manera las condiciones del tracto respiratorio para este tipo de evaluaciones. La composición química del medio ASM simula el mucus y mimetiza *in vitro* el entorno ambiental de la mucosa respiratoria de un paciente fibroquístico (270). Aunque sus componentes no reproduzcan la composición química de la mucosidad característica del tracto respiratorio de pacientes sin neumopatía de base, igualmente se asemeja más a ella que un medio de cultivo estándar como el TSB. El uso de ASM propició reproducir *in vitro* la condición de co-aislamiento de estos microorganismos, que se observa a menudo *in vivo* en diferentes tipos de muestra respiratoria. Sin embargo, este medio de cultivo presenta algunos inconvenientes, como su viscosidad y turbidez, que dificultaron su uso en algunos de los ensayos realizados en este estudio. Por otro lado, los mecanismos fisiológicos o moleculares que podrían ayudar a elucidar la razón de por qué la presencia del medio ASM favorece la coexistencia entre estos microorganismos, observada tanto en cultivo planctónico como en *biofilm* mixto, no han sido objeto de estudio en esta tesis.

En cuanto al antagonismo de *P. aeruginosa* hacia *S. aureus* en las diferentes condiciones analizadas, que fueron realizadas con medio de cultivo estándar, cabe destacar que todos los co-aislados clínicos de *P. aeruginosa* evaluados resultaron productores de piocianina. La piocianina, que también es producida durante la formación de *biofilm* de *P. aeruginosa*, tiene una función importante en las infecciones agudas y crónicas de las vías respiratorias. Esta molécula alcaloide permite la supervivencia anaeróbica del microorganismo, además de actuar como un compuesto antimicrobiano que afecta el metabolismo energético de *S. aureus* (164, 172). Sin embargo, estudios recientes apuntan a las glucoproteínas de la mucina, uno de los principales componentes del medio ASM, como reguladoras de la virulencia microbiana (271) debido a sus propiedades antimicrobianas (272). Por tanto, la presencia de estas glucoproteínas podría estar implicada en la reducción, tanto de la producción como del efecto, de la piocianina u otras sustancias de efecto anti-estafilocócico que son secretadas por *P.*

*aeruginosa*, durante el crecimiento o formación de *biofilm* mixto cultivado con este medio.

Otro aspecto a considerar, y que podría haber influido en la coexistencia entre los dos microorganismos, cuando fueron crecidos en ASM, es que el sistema QS-*pqs* de *P. aeruginosa*, generalmente inducido en la presencia de Gram positivos (258), tuviera su expresión disminuida bajo estas condiciones de cultivo. En nuestro estudio se evaluó únicamente la expresión de uno de los genes pertenecientes al sistema QS-*pqs*, el gen *pqsL* que es el responsable de la síntesis de HQNO. Sin embargo, *P. aeruginosa* produce una amplia variedad de moléculas que inhiben a *S. aureus* en condiciones de cultivo *in vitro*, donde la mayoría de ellas (piocianina, elastasa, raminolípidos, HQNO y otras) son reguladas por este sistema (166). El número de moléculas y las cantidades producidas varían entre las diferentes cepas y condiciones de crecimiento (planctónico vs. *Biofilm*, presencia de antibióticos, entre otros) (164). Por lo tanto, la presencia del medio ASM podría haber influido en la actividad del sistema QS-*pqs*, disminuyendo como consecuencia la producción de algunos de estos factores de virulencia que afectarían la viabilidad de *S. aureus*.

No obstante, puede que la expresión del gen *pqsL* y su consecuente producción de HQNO sean también ventajosas para *S. aureus* en algunos casos. Se ha demostrado que la presencia de HQNO, además de inducir la formación de SCV, un fenotipo resistente a condiciones ambientales adversas, actúa también disminuyendo la susceptibilidad de *S. aureus* a los antimicrobianos dirigidos a la pared celular y a la síntesis de proteínas (255, 273). De esta manera, la activación del sistema QS-*pqs* de *P. aeruginosa* en presencia de *S. aureus* acabaría proporcionándole protección a ciertas clases de antibióticos. Este aspecto se propone evaluar en futuros experimentos y daría pistas sobre el manejo de los tratamientos antimicrobianos en infecciones mixtas.

Por otro lado, la presencia de un medio de cultivo viscoso como el ASM, restringe la migración celular de *P. aeruginosa*, lo que influye directamente en la microbiogeografía de estas poblaciones durante las interacciones polimicrobianas (260). *P. aeruginosa* aumenta la producción de moléculas con efecto anti-estafilocócico cuando detecta fragmentos de la pared celular de *S. aureus*, lo que sugiere que cuando estas especies se encuentran muy cerca, *P. aeruginosa* podría eliminar a *S. aureus*. De este modo, la viscosidad del medio podría estar favoreciendo la organización espacial adoptada por estas dos especies, lo que permite la co-existencia entre ambas en *biofilm* mixto formado bajo esta condición de cultivo.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo demuestra la importancia de la diversidad genética de los aislados que forman parte del mismo nicho ecológico en las relaciones interespecies. Además, destaca que esta diversidad microbiana a la vez que aumenta la complejidad del trabajo, dificulta la comparación y correlación con otros estudios publicados, que utilizan en su mayoría cepas bacterianas de referencia o

aislados clínicos provenientes de pacientes, cuyo contexto clínico es diferente de las ITRI aguda. Por lo tanto, este trabajo en cuanto al campo de las ciencias biomédicas aporta nuevos conocimientos respecto a los fenotipos de virulencia exhibidos por estos dos microorganismos, en el contexto de las interacciones microbianas en pacientes con ITRI aguda.

Sin embargo, se requiere de una investigación adicional más amplia para dilucidar con mayor precisión los mecanismos bacterianos que favorecen la coexistencia entre estos co-aislados clínicos, y que contrarresta el antagonismo de *P. aeruginosa*, en la presencia del medio de cultivo ASM.

En cuanto al impacto en la evolución clínica, la co-existencia y las interacciones entre *S. aureus* y *P. aeruginosa* en el microbioma respiratorio de pacientes con ITRI aguda podría resultar en un aumento de la virulencia de una o ambas especies (262). Esto a su vez podría influir tanto en el curso de la infección como en la respuesta a la terapia (164). Recientemente se ha demostrado que la susceptibilidad a los antibióticos es compleja, y que no depende únicamente de las características fenotípicas y genotípicas del patógeno, sino que también de las interacciones de este con otros microorganismos en el entorno de la infección (274).

Por lo tanto, si consideramos la penetración limitada de algunos antimicrobianos en el parénquima pulmonar (217), junto con la capacidad de estos patógenos de residir intracelularmente en las células del hospedador (88, 95) y de formar *biofilm*, el co-aislamiento de estos microorganismos en muestra respiratoria, en determinados grupos de pacientes, podría tener una importancia clínica relevante.

## CONCLUSIONES

---

1. El aislamiento persistente de *S. aureus* en el tracto respiratorio inferior, es frecuente en pacientes sometidos a ventilación mecánica (VM) a pesar de la administración de un tratamiento antibiótico ajustado al antibiograma. Sin embargo, no se correlaciona con una evolución clínica desfavorable.
2. El aislamiento persistente es más frecuente en los casos de MRSA, aunque también se observa en aislados de MSSA. Por lo tanto, otros factores además del perfil de resistencia a la meticilina estarían implicados en la persistencia de *S. aureus* en el tracto respiratorio.
3. En cuanto a las características genóticas analizadas de los aislados no se observan diferencias significativas respecto a los grupos de estudio y la evolución clínica, aunque la presencia de algunos genes relacionados con la adhesión se asocia con la persistencia, la duración de la estancia en UCI y los días de VM.
4. El sistema Agr es funcional en un alto porcentaje de los aislados de *S. aureus* obtenidos de muestra respiratoria de pacientes con infección aguda del tracto respiratorio inferior.
5. La actividad del sistema Agr, regulador de la virulencia, no se correlaciona con la evolución clínica de pacientes con ITRI aguda, ni con la persistencia en el tracto respiratorio.
6. La capacidad de formación de *biofilm* se correlaciona con la funcionalidad del sistema Agr en los aislados obtenidos de muestra respiratoria de pacientes con ITRI, lo que sugiere una posible implicación de este sistema en la adaptación del microorganismo a este nicho ecológico.
7. Las cepas clínicas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* co-aisladas de pacientes con ITRI aguda presentan una relación antagónica *in vitro*, de forma similar a lo que ocurre en determinadas enfermedades respiratorias crónicas. *P. aeruginosa*, en condiciones de cultivo mixto con medios estándar de laboratorio produce una amplia variedad de moléculas que influyen sobre el crecimiento y la capacidad de formación de *biofilm* de *S. aureus*.
8. El uso de un medio de cultivo que simula la mucosidad del tracto respiratorio promueve la coexistencia de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, en cultivos planctónicos, así como en estructuras complejas como el *biofilm* bacteriano. En condiciones de cultivo mixto en el medio que simula el mucus respiratorio, se observa una

alteración de la actividad de los sistemas de *quorum sensing* de *S. aureus* (Agr) y *P. aeruginosa* (PQS) respecto a las condiciones de cultivo simple.

9. La utilización de este tipo de medio y la metodología de los ensayos de interacción permiten reproducir *in vitro* la condición de co-aislamiento entre microorganismos que se observa a menudo en el contexto de las infecciones de naturaleza polimicrobiana del tracto respiratorio.

**Este trabajo resalta la importancia de investigar las interacciones microbianas en el tracto respiratorio inferior: 1. En el contexto clínico, donde la interferencia de una especie sobre la otra puede aumentar el desarrollo de fenotipos de virulencia, alterar el curso de la enfermedad y la respuesta a la terapia antimicrobiana y 2. En el contexto de la homeostasis del microbioma pulmonar, visto que las relaciones interespecies pueden comprometer también la estructura poblacional de las comunidades bacterianas que promueven la salud del hospedador.**

## ANEXOS

**Anexo 1. Hoja de recogida de datos clínico-epidemiológicos****DATOS DE PACIENTES SOMETIDOS A VENTILACIÓN MECÁNICA Y AISLAMIENTO DE  
*S. aureus* EN MUESTRAS DE ASPIRADO TRAQUEAL**

1. Apellidos, Nombres: Edad:
2. NHC:
3. Fecha de ingreso \_\_/\_\_/\_\_
4. Sexo: 1) hombre 2) mujer
5. Enfermedades subyacentes: 0) no; 1) diabetes; 2) enfermedad respiratoria crónica; 4) neoplasia; 5) insuficiencia renal crónica; 6) hepatopatía; 7) inmunosupresión (especificar)
6. Grupo de ingreso en UCI: 1) Traumático; 2) Médico; 3) Quirúrgico
7. Gravedad al ingreso: APACHE y Glasgow
8. Afectación del Sistema Nervioso Central (SCN): 1) sí; 2) no
9. Tipo de afectación SNC: 1) TCE; 2) Ictus isquémico; 3) Ictus hemorrágico; 4) Otros
10. Colonización faríngea al ingreso: *S. aureus* sensible, SARM, Flora comensal
11. Sospecha de infección:
12. Días de ventilación mecánica: nº días (en el momento de recogida de las muestras)
13. Muestras: 1) Aspirado traqueal; 2) Suero/plasma
14. Valor CPIS (Clinical Pulmonary Infection Score):
15. Microorganismo/s aislado/s: (identificación y antibiograma/ Microbiología)
16. Grupo de estudio asignado: 1) colonización; 2) traqueobronquitis; 3) neumonía
17. Tratamiento previo a obtención de la muestra: sí/no, antibiótico:
18. Tratamiento post-obtención muestra: sí/no, antibiótico:
19. Inicio del tratamiento: 1) empírico; 2) post-información microbiológica
20. Persistencia del aislamiento en la muestra respiratoria post-tratamiento: sí/no
21. Días de persistencia del aislamiento post-tratamiento: nº días
22. Evolución: 1) curación; 2) complicación respiratoria (insuficiencia respiratoria/ bacteriemia); 3) complicación no respiratoria (ej. bacteriemia de otro origen)
23. Exitus: sí/no; 1) relacionado con la infección respiratoria; 2) no relacionado

---

## Anexo 2. Medios de cultivo microbiológico

---

### Medio LB (Luria Bertani)

Para preparar el medio LB líquido, se disolvió en 1 L de agua destilada 10 g de triptona, 5g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se dispensó en botellas de 100 mL y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C. Las botellas se almacenaron a temperatura ambiente.

Para preparar el medio LB agar se añadió 17 g de agar a 1 L de medio LB líquido, se esterilizó con las condiciones descritas anteriormente y se dispensó en placas de petri hasta que se solidificaron. Las placas se almacenaron a 4°C.

### Medio caldo tríptico de soja (TSB, del inglés *Tryptic Soy Broth*)

Para preparar el medio TSB, se disolvió 30 g de TSB (Difco™) en 1 L de agua destilada, se dispensó en botellas de 100 mL y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C. Las botellas se almacenaron a temperatura ambiente.

Para preparar el medio TSB agar (TSA) se añadió 17 g de agar a 1 L de medio TSB, se esterilizó con las condiciones descritas anteriormente y se dispensó en placas de petri hasta que se solidificaron. Las placas se almacenaron a 4°C.

### Medio TSB 0.5X glucosa 1%

Medio de cultivo recomendado para la formación de *biofilm* de *S. aureus* (275). Se disolvió 15g TSB (Difco™) y 10 g de glucosa en 1 L de agua destilada. Se dispensó en botellas de 100 mL y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C. Las botellas se almacenaron a temperatura ambiente.

### *Artificial sputum medium*<sup>+</sup> (ASM<sup>+</sup>)

Se trata de un medio de cultivo formulado para simular el esputo de pacientes con fibrosis quística (270). Los componentes para preparar el medio ASM<sup>+</sup> son: mucina (Sigma-Aldrich) 0,5% (p/v), DNA de esperma de salmón (Sigma-Aldrich) 0,4% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), KCl 0,2% (p/v), casaminoácidos (Difco™) 0,5% (p/v), emulsión de yema de huevo (*Egg Yolk Emulsion*, Oxoid) 0,25% (v / v) y ácido dietileno triamina penta acético (DTPA) (Sigma) 0,0005% (p/v).

Se disolvió por separado y en agitación la mucina y el DNA de esperma de salmón a 50°C y durante varias horas hasta obtener una solución homogénea. Como tampón se disolvieron las sales NaCl y KCl, y luego se ajustó el pH a 7. Para el DTPA se preparó una solución stock estéril a 1 mg/mL en NaOH 1 M. Cada uno de los componentes se añadió en agua estéril con agitación vigorosa en el siguiente orden. Se preparó con agitación una mezcla homogénea entre el DNA, la mucina, las sales y el DTPA y se volvió a ajustar el pH a 7. Se esterilizó en autoclave durante 13 min a 115°C, y se dejó enfriar hasta

50°C. En condiciones estériles se añadió posteriormente la mezcla de casaminoácidos y la emulsión de yema de huevo. El medio se almacenó a 4°C.

### **Medio BM2**

El medio BM2 modificado (276) contiene 62 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$ , 0,4 % de glucosa (p/v) y 0,5 % de casaaminoácidos (p/v) (Difco™). Se prepararon diferentes soluciones stock para cada uno de los componentes a mayor concentración y se esterilizó en autoclave por separado durante 15 min a 121°C. La solución stock de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  fue ajustada previamente a pH 7. Las cantidades apropiadas de cada solución stock fueron mezcladas con agua destilada estéril al volumen final deseado. Para preparar BM2 agar se añadió el agar noble (Difco™) al 0,5 % o al 2 % (p/v) al volumen final deseado de agua destilada y se esterilizó durante 15 min a 121°C. En condiciones estériles se añadió posteriormente a esta mezcla las cantidades apropiadas de cada solución stock, y se dispensó en placas de petri hasta que se solidificaron.

### **Medio AB suplementado con glucosa**

Se trata de un medio mínimo de crecimiento para el cultivo bacteriano (277). Para preparar 1L de medio se prepararon las soluciones A y B por separado. Para la solución A se disolvió 2 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 g de NaCl y 0.4 g de glucosa en 200 mL de agua destilada, y se esterilizó en autoclave durante 13 min a 115°C. Para la solución B se añadió a 797 mL de agua estéril, 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  a 0,1 M, 1 mL de  $\text{MgCl}_2$  a 1,0 M y 1 mL de  $\text{FeCl}_3$  a 0,003 M. Posteriormente se añadieron los 200 mL de la solución A en los 800 mL de la solución B. El medio se almacenó a temperatura ambiente.

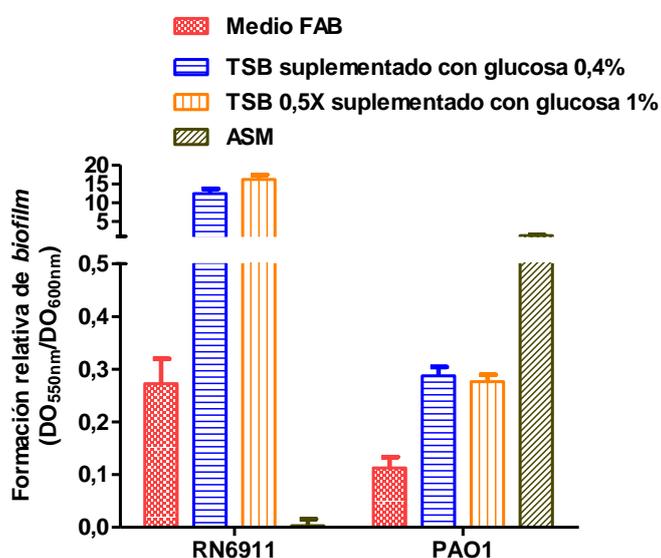
### **Medio FAB**

Este medio tiene la misma composición del medio AB, pero en vez de usar el  $\text{FeCl}_3$  como fuente de hierro, se utilizó Fe-EDTA (278). Para la preparación de 1L de medio FAB se utiliza Fe-EDTA a 0,01 mM.

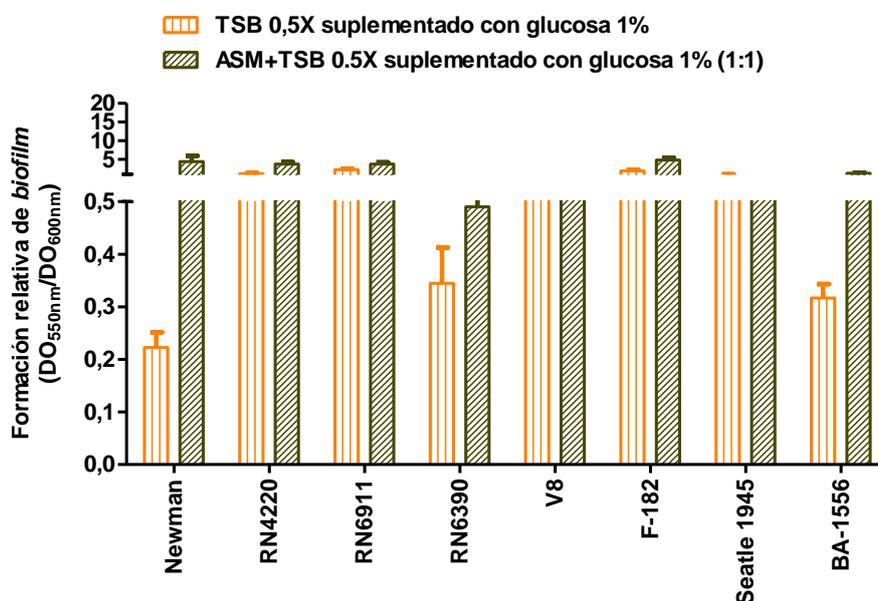
### **Medio agar sangre**

Este medio está constituido por agar Columbia, un medio altamente nutritivo que se usa como base para la preparación de diversos medios de cultivo, suplementado con 5% de sangre de oveja. (Ref. 43041; Biomerieux, Francia).

### Anexo 3. Optimización de las condiciones de cultivo



**Formación relativa de *biofilm* por las cepas de referencia *S. aureus* RN6911 y *P. aeruginosa* PAO1.** Las condiciones de cultivo son: FAB: medio AB suplementado con hierro; TSB suplementado con glucosa 0,4%; TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% y ASM. Las barras representan la formación de *biofilm* relativo ( $DO_{550nm}$  CV/ $DO_{600nm}$  cultivo) en las placas de microdilución y las líneas de error la desviación estándar de dos réplicas biológicas con 12 réplicas técnicas por condición.



**Formación relativa de *biofilm* por las cepas de referencia *S. aureus*.** Las condiciones de cultivo son: TSB 0,5X suplementado con glucosa 1% y una mezcla 1:1 de medio ASM y TSB 0,5X suplementado con glucosa 1%. Las barras representan la formación de *biofilm* relativo ( $DO_{550nm}$  CV/ $DO_{600nm}$  cultivo) en las placas de microdilución y las líneas de error la desviación estándar de dos réplicas biológicas con 12 réplicas técnicas por condición.

## Anexo 4. 26<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

### Identifying genetic determinants of persistent *Staphylococcus aureus* during bacteremia and lower respiratory tract infections

A.Lacoma 1, C.-H. Wu 6, S. Monecke 3,4,5, S.Molinós 1, M.Gomes-Fernandes 1,2, R.Ehricht 4,5, D.J. Wilson 6,7, C.Prat 1

1. Microbiology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, CIBER Enfermedades Respiratorias, Badalona, Spain. 2. CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília. 3. Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Technical University of Dresden, Dresden, Germany. 4. Alere Technologies GmbH, Jena, Germany. 5. InfectoGnostics Research Campus, Jena, Germany. 6. Nuffield Department of Medicine, Experimental Medicine Division, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK. 7. Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Roosevelt Drive, Oxford, UK.

#### OBJECTIVE

To identify genetic determinants or patterns from *Staphylococcus aureus* that may be related to its persistence in blood of patients with bacteraemia and in tracheal aspirates of patients undergoing mechanical ventilation despite a treatment adjusted to susceptibility test results.

#### MATERIAL AND METHODS

**Study populations.** Two cohorts were analyzed: patients with *S.aureus* bacteraemia and patients admitted at ICU and under mechanical ventilation with diagnosis of bronchial colonization, tracheobronchitis and pneumonia from whom *S. aureus* was isolated in endotracheal aspirate sample (ETA). Clinical and epidemiological variables were recorded for all patients. **Persistence** was considered in cases of repeated isolation from blood cultures or ETA, respectively, after 72 h of therapy adjusted to susceptibility test results. Based on the recovery of *S.aureus* after 72h, both cohorts were split in "persistently" and "transiently" infected subgroups.

**Strain's phenotypical and genotypical characterization.** Clinical strains (one strain/patient) were phenotypically characterized by conventional identification methods. Strains were frozen and, subsequently, genotypically characterized with a commercial DNA microarray (*S. aureus* Genotyping, Alere Technologies, Germany). DNA microarray data include the clonal complex affiliation, and detects among others, the presence of **specific resistance and virulence genes** and their allelic variants (Figure 1). Presence of a specific gene can be categorized as positive, negative or ambiguous.

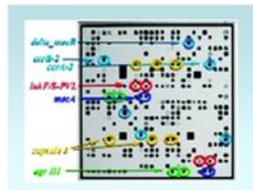


Figure 1. Genotypical characterization by means of DNA microarray.

**Genome wide association studies.** Genome-wide association tests were performed using a recently described statistical tool for mapping the genes that influence bacterial phenotypes of interest (<http://www.danielwilson.me.uk/virulogenomics.html>). The Bonferroni method was used to correct for multiple testing. Manhattan plots were used to summarize the results representing each individual gene and its association to the phenotype of interest (persistence). The bacterial population structure was taken into account when testing for an association between the phenotype of interest and the genetic variants selected.

#### RESULTS

- A total of 81 respiratory strains were analyzed and all DNA microarray results were valid.
- There were 43 cases classified as "transient" and 38 as "persistent".
- Table 1 shows the distribution of cases according to the study group considered and according to cloxacillin resistance. There were no statistical differences between the phenotype of interest and the study group considered nor the cloxacillin resistance pattern.
- Manhattan plots (Figure 2) show that no genes appear to be strongly associated with persistent isolation, even after correcting for population structure.

Table 1. Distribution of study group and cloxacillin resistance pattern according to the phenotype of interest for respiratory strains.

Study group	Transient (%)	Persistent (%)
Colonization (n=26)	14 (32.5)	12 (31.6)
Tracheobronchitis (n=32)	18 (41.9)	14 (36.8)
Aspiration pneumonia (n=1)	1 (2.3)	-
Pneumonia (n=22)	10 (23.3)	12 (31.6)
<b>Total (n= 81)</b>	<b>43 (53)</b>	<b>38 (47)</b>
<b>Cloxacillin resistance</b>		
MRSA (n=14)	6 (42.9)	8 (57.1)
MSSA (n=67)	37 (55.2)	30 (44.8)

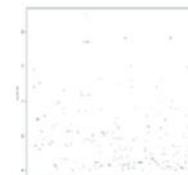


Figure 2. Manhattan plot for the respiratory strains. In the X axis are represented individually all the genes in arbitrary order, and in the Y axis the negative log base 10 p-value. Cut off point at 5% after Bonferroni correction is 3.215.

- A total of 86 bacteraemia strains were included, and 9 were considered "persistent" and 77 were considered "transient" (Table 2).
- The gene *ermC* showed a substantially stronger association with persistent bacteraemia than other genes, whether or not the analysis accounts for population structure (Figure 3). However, this potential association has to be cautiously interpreted.

Table 2. Distribution of bacteraemia strains according to the phenotype of interest and cloxacillin resistance.

Study group	Positive BC after 72h	Negative BC after 72h
Bacteraemia (n= 86)	9 (10.4)	77 (89.6)
<b>Cloxacillin resistance</b>		
MRSA (n=22)	4 (18.1)	18 (81.9)
MSSA (n=64)	5 (7.8)	59 (92.2)

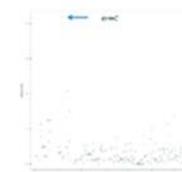


Figure 3. Manhattan plot for the bacteraemia strains. Cut off point at 5% after Bonferroni correction is 3.215.

- Overall results show that no significant association was found for any gene in the two study populations regarding persistence confirming our previous results obtained by conventional univariate and multivariate statistical analyses

#### CONCLUSIONS

- Genome wide association studies are useful to analyse complex databases combined with multiplex genotyping, e.g., microarrays or next generation sequencing.
- No significant correlations were found between bacterial genetic variants and persistence of *S.aureus* suggesting that alternative factors such as host factors might be related. Another aspect to be considered is the role of bacterial gene expression regulation, protein translation and transport.

Project funded by Sociedad Española de Cirugía Torácica (SEPAR) P054/2011 and ISCIII FIS P13/01418; PI: Cristina Prat (crisprat2010@gmail.com)

## Anexo 5. 49º Congreso Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica



### Combinación de datos clínico-epidemiológicos y datos genéticos del microorganismo en pacientes sometidos a ventilación mecánica: utilidad de un método exploratorio de datos

A.Lacoma <sup>1,4</sup>, M.Gomes-Fernandes <sup>1,4,5</sup>, E.Mesalles <sup>2</sup>, F.Arméstar <sup>2</sup>, R.Villar <sup>1,4</sup>, I.Casas <sup>3</sup>, S.Molinis <sup>1,4</sup>, M.Giménez <sup>1,4</sup>, N.Pagán <sup>1</sup>, C.Prat <sup>1,4</sup>.

1. Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona. 2. Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona. 3. Servicio de Medicina Preventiva, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona. 4. CIBER Enfermedades Respiratorias. 5. CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasilia.

**Objetivos:** 1). Evaluar un análisis exploratorio de datos en una cohorte de pacientes sometidos a ventilación mecánica con aislamiento de *Staphylococcus aureus* en muestra respiratoria y 2). Realizar un análisis exhaustivo que permita identificar asociaciones relevantes entre todas las variables recogidas, así como en función de los diferentes grupos de estudio.

**Material y Métodos:** Previo acuerdo de confidencialidad se combinaron en un único fichero, los datos clínico-epidemiológicos provenientes de una base de datos SPSS con los datos genéticos del microorganismo que estaban en formato excel. Estos últimos se obtuvieron a partir de un *microarray* de DNA que detecta la presencia/ausencia de distintos genes codificantes para factores de virulencia. Los datos se combinaron, analizaron y exploraron automáticamente mediante el software "AutoDiscovery" (Butler Scientific S.L., www.butlerscientifics.com), con el objetivo de conocer qué factores del paciente y qué genes del microorganismo caracterizan mejor a la cohorte de pacientes en función del grupo de estudio, la persistencia en el aislamiento pese a recibir tratamiento ajustado a antibiograma (>72h) y el desarrollo de complicaciones respiratorias, incluyendo la mortalidad. Los grupos de estudio fueron: pacientes con colonización bronquial, traqueobronquitis, y neumonía. También se incluyó un grupo de portadores nasales ingresados en UCI en el mismo periodo como grupo control. El análisis estadístico se hizo con el software SPSS v15.

**Resultados:**

- El EDA permite explorar diferentes y múltiples comparaciones entre las distintas variables de estudio, ordenándolas según la relevancia y su presencia/ausencia en los diferentes grupos de estudio (Figura 1).
- Algunas de las asociaciones resultantes confirmaron correlaciones previamente obtenidas en el análisis estadístico univariante y multivariante realizado con métodos estadísticos contrastados. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de resultado confirmado con el método EDA, que muestra que la persistencia en el aislamiento pese a ser más frecuente en aquellos casos con aislamiento de *S.aureus* meticilín resistente (MRSA), también se observa en cepas sensibles (MSSA).
- Por otro lado también permite generar y extraer relaciones no hipotetizadas en un primer momento seleccionando las variables de interés (Figura 3). En caso de que exista alguna relación, está debe confirmarse posteriormente.

Figura 1. Imagen con resultados después de realizar EDA.

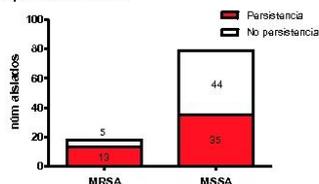


Figura 2. Distribución de las cepas (MRSA y MSSA) en función de si se aislaron en casos persistentes o no persistentes (p=0,039).

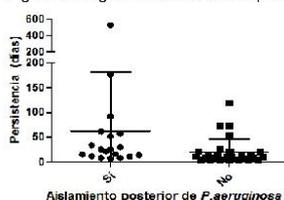


Figura 3. Días de persistencia en función de si hubo aislamiento posterior de *P.aeruginosa* al considerar los tres grupos de estudio (p=0,0086).

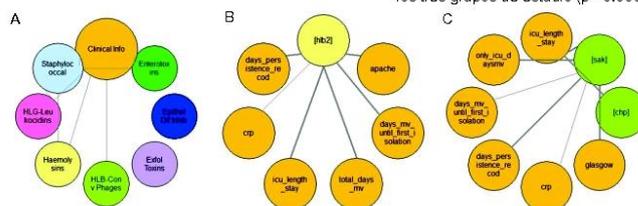


Figura 4. A. Representación de las relaciones existentes entre las sondas incluidas en el array de DNA y el conjunto de variables clínicas. B. Relaciones existentes entre el gen *h1b2* (perteneciente al grupo de hemolisinas) y las variables clínicas. C. Relaciones existentes entre los genes *sak* y *chp* (*h1b* converting phages) y las variables clínicas.

- Se analizaron en detalle las relaciones más relevantes entre el gen *h1b* y las variables clínicas (Figura 4). Se detectaron más días de ventilación mecánica, mayor estancia en UCI y más días transcurridos desde el inicio de la intubación hasta el primer aislamiento en el grupo de pacientes con neumonía. En todos los casos, el aumento de días se correspondió con la presencia del gen.
- Por otro lado, se analizaron las relaciones existentes con los genes pertenecientes al grupo *h1b* *converting bacteriophages*, destacando el gen *chp* y *sak*. La presencia del gen *chp* se asoció a una mayor estancia en UCI, aunque solamente en el grupo de pacientes portadores. En cambio, la presencia del gen *sak* se relacionó a una mayor estancia en UCI en el grupo de pacientes con traqueobronquitis.

**Conclusiones:** El software AutoDiscovery es una herramienta útil para extraer, de forma eficiente, relaciones entre bases de datos complejas con un número de variables amplio que puedan ser confirmadas posteriormente y que mejoren las conclusiones e impacto del trabajo. Las herramientas de análisis exploratorio de datos facilitan la identificación de patrones y correlaciones inesperadas.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto FIS PI13/01416, integrado en el plan Nacional de I+D+i y cofinanciado por el ISCIII-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). SEPAR 054/2011. IP: Cristina Prat (crisprat2010@gmail.com)

## Anexo 6. 27<sup>th</sup> European Respiratory Society International Congress

### Detection of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus* derived respiratory strains: correlation with microbiological and clinical variables

A. Lacombe<sup>1,3</sup>, M. Laabel<sup>1</sup>, O. Plans Galván<sup>2</sup>, S. Martínez Vega<sup>2</sup>, M. Gomes-Fernandes<sup>1,4</sup>, F. Arméstar<sup>2</sup>, C. Villanueva<sup>2</sup>, P. Ricart<sup>2</sup>, C. Prat<sup>1,3</sup>

1. Microbiology Department 2. Intensive Care Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona

3. CIBER Enfermedades Respiratorias 4. CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília

#### OBJECTIVES

- To detect Hla production in *S.aureus* strains isolated from lower respiratory tract.
- To analyze if Hla correlates with microbiological and clinical variables.

#### MATERIAL AND METHODS

**Study population.** Patients admitted to ICU (2 years period) and from whom *S.aureus* was isolated in tracheal aspirate were selected. A control group of *S.aureus* nasal carriers admitted at ICU was also included. Epidemiological, radiological, clinical and microbiological data were recorded. Clinical outcome assessment included days of mechanical ventilation, length of ICU stay, development of respiratory complications (respiratory failure, atelectasia, empyema, pleural effusion, pneumothorax, reinfection and shock) and mortality related to the infection process.

**Lower respiratory tract infection.** Patients were clustered into pneumonia, tracheobronchitis or bronchial colonization according to Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS). Pneumonia (CPIS  $\geq 6$ ), was considered ventilator associated (VAP) when its onset occurred after  $\geq 48$  hours of MV. Ventilator associated Tracheobronchitis (VAT) was defined using the following criteria: fever ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) with no other recognizable cause, purulent secretion, positive culture of respiratory specimen at significant threshold, and no radiographical signs of new pneumonia (CPIS $<6$ ). Bronchial colonization was defined as *S.aureus* isolation but absence of the aforementioned clinical, microbiological and radiological features. Data regarding antimicrobial therapy before and after culture result, adequacy of antibiotic treatment adjusted to susceptibility testing were recorded. Selecting only those patients receiving adjusted antibiotic treatment after culture result, persistent isolation in respiratory sample was considered when it lasted more than 72 hours.

**Strain's phenotypical and genotypical characterization.** Clinical strains (one strain/patient) were phenotypically characterized by conventional identification methods. Isolates were genotypically characterized with a commercial DNA array (*S. aureus* Genotyping, Alere Technologies, Germany). The activity of the accessory gene regulator (*agr*) operon was detected by a vesicle lysis test (VLT) (PLoS One. 2014 Jan 30;9(1):e8727). Alpha-toxin production was detected by western-blot (WB), and result was considered positive/ negative (Figure 1).

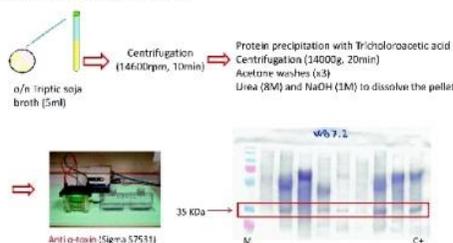


Figure 1. Alpha toxin detection protocol. (M: molecular weight ladder; C+: Positive control, corresponds to USA300 isolate, a *S.aureus* strain that produces high amounts of alpha toxin)

#### RESULTS

- A total of 108 cases were analyzed and male represented 64.8%. Mean age and APACHE-II were 59.1(SD 16.6) and 18.5 (SD8.5), respectively.
- There were 87 methicillin susceptible (MSSA) and 21 methicillin resistant *S.aureus* (MRSA). Among the 87 cases MSSA, clonal complexes (CC) more frequent were CC30 (18.4%) and CC5 (17.2%), while for MRSA cases it was CCS-MRSA-IV *Pediatric clone* (38.1%).
- All strains were positive for *hla* gene. Hla WB was performed twice for each strain, and was detected in 62 isolates (57.4%). Regarding accessory gene regulator functionality, most of the isolates VLT positive were Hla producer ( $p=0.057$ ).
- The distribution of Hla WB results according to the study group almost reached statistical significance ( $p=0.079$ ), with the highest percentage of Hla producer strains in pneumonia group (Table 1).

Hla WB	STUDY GROUP				TOTAL
	Nasal Carriage (%)	Colonization (%)	Tracheobronchitis (%)	Pneumonia (%)	
Negative	16 (61.5)	11 (36.7)	14 (43.8)	5 (25)	46 (42.6)
Positive	10 (38.5)	19 (63.3)	18 (56.3)	15 (75)	62 (57.4)
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>20</b>	<b>108</b>

- There were 18 cases that developed respiratory complication and/or mortality related: 13 corresponded to patients with pneumonia (72.2%), 4 patients were classified as tracheobronchitis (22.2%) and the last one as bronchial colonized (5.6%) ( $p<0.001$ ).
- Considering these 18 cases with unfavourable outcome, alpha-toxin was detected in 14 of them (77.8%); whereas for the remaining 90 cases, the percentages of Hla producer (53.3%) and Hla non-producer strains (46.7%) were similar ( $p=0.098$ ).
- There was no correlation between ICU length of stay ( $p=0.384$ ) and days of mechanical ventilation ( $p=0.784$ ) according to Hla production.
- Persistent isolation of *S.aureus* in respiratory sample despite adjusted antimicrobial therapy was observed in 40 cases (13 bronchial colonized, 15 tracheobronchitis and 12 pneumonia). No correlation was found between Hla production and persistence ( $p=0.546$ ).

#### CONCLUSIONS

- Alpha-toxin can be detected in *S.aureus* clinical strains isolated from the lower respiratory tract.
- The presence of alpha-hemolysin correlate with unfavourable outcome, which is more frequent in patients with pneumonia.
- Presence of Hla did not correlate with persistent isolation in the lower respiratory tract.

Project funded by Sociedad Española de Cirugía Torácica (SEPAR) P054/2011 and ISCIII FIS P113/01418; PI: Cristina Prat (crisprat2010@gmail.com)

# Anexo 7. 28<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

## Cross-interferences in quorum sensing-related phenotypes between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-isolated from lower respiratory tract samples



Meissiner Gomes-Fernandes<sup>1,2,3,4</sup>, Marta Calvet<sup>3</sup>, Xavier Coves<sup>3,4</sup>, Pol Huedo<sup>3</sup>, Alicia Lacoma<sup>1</sup>, Isidre Gibert<sup>3,4</sup>, Cristina Prat<sup>1,4</sup> and Daniel Yero<sup>3,4</sup>

1. Microbiology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, CIBER Enfermedades Respiratorias, 2. CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília, 3. Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, 4. Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona.



### INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are common pathogens in lower respiratory tract infections (LRTI). Both pathogens utilize different quorum sensing (QS) communication systems to coordinate the expression of virulence factors, including those involved in biofilm formation (1). Biofilm formation has been associated with a poor clinical evolution for infections caused by both pathogens. In this work, we analyzed the cross-interference between co-isolated *S. aureus* and *P. aeruginosa* clinical strains with regard to both biofilm development *in vitro* and the activity of the main QS system in each species.

### METHODS

*S. aureus* and *P. aeruginosa* clinical strains were isolated simultaneously (co-isolated) from five patients admitted to ICU in a tertiary university hospital with suspicion of LRTI. Three of them were diagnosed with tracheobronchitis, while the other two patients were considered as bronchial colonized. All *S. aureus* were methicillin susceptible and none of the *P. aeruginosa* clinical strains were multi drug resistant. Phenotypic and genotypic characteristics of the co-isolated strains are shown in table 1.

Table 1. Characteristics of co-isolated clinical strains

ID	<i>S. aureus</i> (SAR)				<i>P. aeruginosa</i> (PAR)			
	agr-QS functionality <sup>a</sup>	agr allele <sup>b</sup>	Clonal Complex <sup>c</sup>	*Biofilm Formation <sup>d</sup>	*Pigment Production <sup>e</sup>	*AHL <sup>f</sup>	*Protease Production <sup>g</sup>	*Biofilm Formation <sup>h</sup>
1047	Negative	III	CC30	+++	+++	+	-	+++
7244	Negative	III	CC30	+++	++	+	+++	+++
2746	Positive	I	CC398	++	++	++	++	++
7115	Negative	IV/I	CC121	++	++	+++	++	+
5091	Positive	II	CC5	++	++	++	++	+

<sup>a</sup> agr-QS functionality determined through CAMP assay and qRT-PCR; <sup>b</sup> Strains were genotypically analysed with a DNA microarray based assay (*S. aureus* genotyping, Alere Technologies); <sup>c</sup> Biofilm quantification was determined through crystal violet staining in microtiter plates; <sup>d</sup> Pyocyanin and pyoverdinin were visually inspected on King's medium agar plate; <sup>e</sup> AHLs quantification was determined through  $\beta$ -galactosidase-based bioassay; <sup>f</sup> Protease activity was estimated in Egg Yolk agar plates; +, low; ++, medium; +++, high.

To evaluate the effect of the exoproducts from one species on the QS system and QS-related phenotypes of the other species of the same co-isolated pair, filtered supernatant were used (Figure 1).

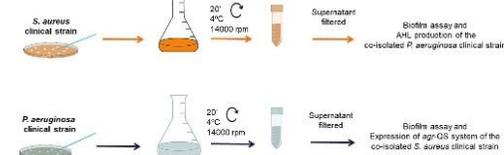


Figure 1. Cross-interference in vitro assay methodology.

Biofilm formation was determined using a polystyrene microtiter plate based assay (2). A mucic-like medium (ASM) (3) and the tryptic soy broth (TSB) supplemented with 1% glucose (4) were used to perform the assays. AHLs (acyl homoserine lactones) quantification was performed by determining  $\beta$ -galactosidase activity using a biosensor strain (5). Expression of agr-QS system was determined using CAMP assay and qRT-PCR of RNAIII (6).

### References:

1. Hentrich A et al. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 108.
2. Merritt JH et al. Curr Protoc Microbiol 2005; 1: Unit 18.
3. Srinivasulu DD et al. J Med Microbiol 2005; 51: 687-698.
4. Sepanovic S et al. APMB 2007; 115(8): 181-5.
5. Stendler L et al. FEMS 2007; 266(1): 1-9.
6. Gomes-Fernandes M et al. PLoSOne 2017; 12(4): e0175652.

### RESULTS

*P. aeruginosa* affects *S. aureus* growth in planktonic co-culture in TSB based-medium. Furthermore, the extracellular factors secreted by *P. aeruginosa* decreased biofilm formation by *S. aureus* corresponding co-isolated pair.

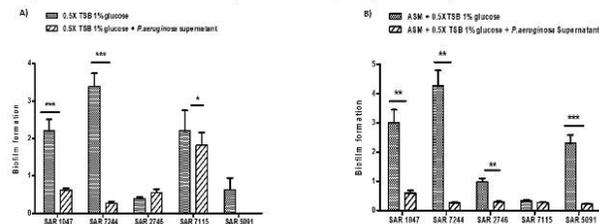


Figure 2. Biofilm formation of *S. aureus* (SAR) clinical strains grown in 0.5X TSB 1% glucose (A) or in ASM+0.5X TSB 1% glucose (1:1) (B) in absence and presence of the diluted 1:10 supernatants of the co-isolated *P. aeruginosa* strains. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 by Unpaired t test.

*S. aureus* exoproducts do not affect AHL production of the co-isolated *P. aeruginosa* strains.

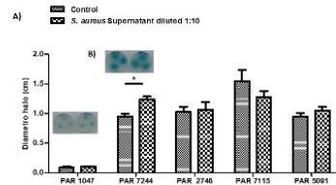


Figure 4. Quantification of AHL production in *P. aeruginosa* (PAR) clinical strains. (A) Measure of diameter of the blue halo. \*p < 0.05 by Unpaired t test, (B) Representative images of AHL production of the PAR 1047 and PAR 7244 clinical strains performed in BM2A tumefaciens KYC355-Gal agar plates, both in absence and presence of the 1:10 diluted supernatants of the co-isolated *S. aureus* strains.

The presence of mucus-based medium promotes the co-existence between *S. aureus* and *P. aeruginosa* in planktonic co-culture and mixed biofilm.

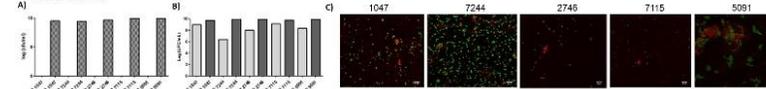


Figure 6. Planktonic growth exhibited by co-isolated *P. aeruginosa* (PAR) and *S. aureus* (SAR) clinical strains in co-culture grown for 24 h in 0.5X TSB 1% glucose (A) and ASM+0.5X TSB 1% glucose (B) using an inoculum of SAR 10 times more than PAR. (C) Representative CLSM images of mixed biofilm formed by *P. aeruginosa* and *S. aureus* co-isolated clinical strains in ASM+0.5X TSB 1% glucose. *P. aeruginosa* was visualized by staining with SYTOX Green and the *S. aureus* was visualized by staining with Texas Red9-X-WGA. Scale bars 5µm.

Overall, exposure to *S. aureus* supernatant does not influence biofilm formation of its co-isolated *P. aeruginosa* strain.

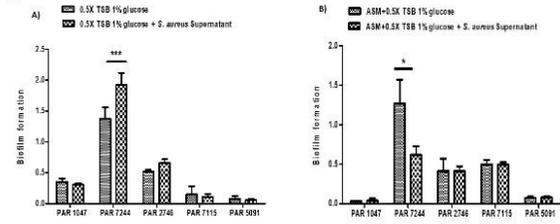


Figure 3. Biofilm formation of *P. aeruginosa* clinical strains grown in 0.5X TSB 1% glucose (A) or in ASM+0.5X TSB 1% glucose (1:1) (B) in the absence and presence of the diluted 1:10 supernatants of the co-isolated *S. aureus* strains \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 by Unpaired t test.

*P. aeruginosa* exoproducts have a slightly influence on agr-QS expression in those co-isolated *S. aureus* strains with functional agr.

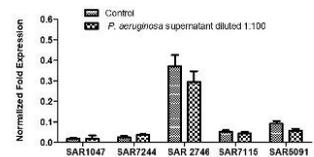


Figure 5. malW gene expression levels in 0.5X TSB 1% glucose, both in the absence and presence of the 1:100 diluted supernatants of the co-isolated *P. aeruginosa* strains. Relative expression normalized to the value of gyrase B housekeeping gene.

### CONCLUSIONS

- P. aeruginosa* clinical strains isolated from patients with acute LRTI outcompete *S. aureus* in standard laboratory culture conditions, as previously reported with isolates from chronic respiratory diseases.
- P. aeruginosa* clinical strains affect the growth and biofilm formation of the co-isolated *S. aureus* in standard laboratory culture media. However, the presence of mucus-based medium promotes the co-existence between both microorganisms, suggesting that this medium could be useful to simulate the native environments of the respiratory tract.

Project funded by Sociedad Española de Cirugía Torácica (SEPAR) P0642011 and ISCIII FIS PI13/01418; PI: Cristina Prat (cristina270@gmail.com)

## BIBLIOGRAFÍA

1. Martín Escribano P, Ramos Seisdedos G, Sanchis Aldás J. Desarrollo y anatomía. Medicina respiratoria. 2ª ed. España: Sociedad Española de Neumología y Cirugía torácica; 2009. p. 11-24.
2. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. American journal of respiratory and critical care medicine. 2011;184(8):957-63.
3. Monso E. The respiratory microbiome: Beyond the culture. Archivos de bronconeumología. 2017;53(9):473-4.
4. Dickson RP, Erb-Downward JR, Prescott HC, Martinez FJ, Curtis JL, Lama VN, et al. Cell-associated bacteria in the human lung microbiome. Microbiome. 2014;2:28.
5. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. Annals of the American Thoracic Society. 2015;12(6):821-30.
6. Dickson RP, Huffnagle GB. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. PLoS pathogens. 2015;11(7):e1004923.
7. Cullen L, McClean S. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. Pathogens. 2015;4(1):66-89.
8. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. mBio. 2015;6(2):e00037.
9. Zakharkina T, Heinzl E, Koczulla RA, Greulich T, Rentz K, Pauling JK, et al. Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. PloS one. 2013;8(7):e68302.
10. Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK. The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. Current opinion in pediatrics. 2011;23(3):319-24.
11. Hotterbeekx A, Xavier BB, Bielen K, Lammens C, Moons P, Schepens T, et al. The endotracheal tube microbiome associated with *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus epidermidis*. Scientific reports. 2016;6:36507.
12. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. Nature. 2007;449(7164):811-8.
13. Steinert M, Hentschel U, Hacker J. Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe-host interaction. Die Naturwissenschaften. 2000;87(1):1-11.
14. Prat C, Lacombe A. Bacteria in the respiratory tract-how to treat? Or do not treat? International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2016;51:113-22.
15. Henriques-Normark B, Normark S. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. Experimental cell research. 2010;316(8):1408-14.
16. van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, et al. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2009;9(1):32-47.
17. Oliver A, Alarcon T, Caballero E, Canton R. Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2009;27(2):89-104.
18. Baquero F, Del Campo R. Bronchial colonization-infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2009;27(2):67-9.
19. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert review of anti-infective therapy. 2013;11(3):297-308.

20. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2017;36(11):1999-2006.
21. Meseguer MA, Begona Cacho J, Oliver A, Puig de la Bellacasa J. Microbiological diagnosis of bacterial lower respiratory tract infections. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2008;26(7):430-6.
22. Brook I, Gober AE. Bacteriology of spontaneously draining acute otitis media in children before and after the introduction of pneumococcal vaccination. *The Pediatric infectious disease journal*. 2009;28(7):640-2.
23. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Staphylococcus* y cocos grampositivos relacionados. *Microbiología Médica*. 6ª ed. St. Louis: Mosby; 2009. p. 209-23.
24. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Executive Summary: Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2016;63(5):575-82.
25. Wang Y, Eldridge N, Metersky ML, Verzier NR, Meehan TP, Pandolfi MM, et al. National trends in patient safety for four common conditions, 2005-2011. *The New England journal of medicine*. 2014;370(4):341-51.
26. Guardiola JJ, Sarmiento X, Rello J. Neumonía asociada a ventilación mecánica: riesgos, problemas y nuevos conceptos. *Medicina Intensiva*. 2001;25(3):113-23.
27. Kalanuria A, Zai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Critical care*. 2014;18(2):208.
28. Bielen K, Jongers B, Boddaert J, Lammens C, G Jorens P, Malhotra-Kumar S, et al. Mechanical ventilation causes IL-4 mediated immunosuppression in a rodent model of mechanical ventilation and VAP<sup>28th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID. 2018:P0611.
29. Rello J, Lisboa T, Koulenti D. Respiratory infections in patients undergoing mechanical ventilation. *The Lancet Respiratory medicine*. 2014;2(9):764-74.
30. Koulenti D, Lisboa T, Brun-Buisson C, Krueger W, Macor A, Sole-Violan J, et al. Spectrum of practice in the diagnosis of nosocomial pneumonia in patients requiring mechanical ventilation in European intensive care units. *Critical care medicine*. 2009;37(8):2360-8.
31. Magret M, Amaya-Villar R, Garnacho J, Lisboa T, Diaz E, Dewaele J, et al. Ventilator-associated pneumonia in trauma patients is associated with lower mortality: results from EU-VAP study. *The Journal of trauma*. 2010;69(4):849-54.
32. Chertow DS, Memoli MJ. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *Jama*. 2013;309(3):275-82.
33. Murray RJ, Robinson JO, White JN, Hughes F, Coombs GW, Pearson JC, et al. Community-acquired pneumonia due to pandemic A(H1N1)2009 *influenza virus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* co-infection. *PloS one*. 2010;5(1):e8705.
34. Bloes DA, Haasbach E, Hartmayer C, Hertlein T, Klingel K, Kretschmer D, et al. Phenol-Soluble Modulin Peptides Contribute to Influenza A Virus-Associated *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Infection and immunity*. 2017;85(12).
35. Bouza E, Giannella M, Bunsow E, Torres MV, Granda MJ, Martin-Rabadan P, et al. Ventilator-associated pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: risk factors and outcome in a large general hospital. *The Journal of hospital infection*. 2012;80(2):150-5.
36. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases*. 2005;5(12):751-62.
37. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et al. *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*. 2007;315(5815):1130-3.

38. Niemann S, Ehrhardt C, Medina E, Warnking K, Tuchscher L, Heitmann V, et al. Combined action of influenza virus and *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin provokes severe lung epithelium damage. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(7):1138-48.
39. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2013;13(1):43-54.
40. Peyrani P, Allen M, Wiemken TL, Haque NZ, Zervos MJ, Ford KD, et al. Severity of disease and clinical outcomes in patients with hospital-acquired pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains not influenced by the presence of the Pantone-Valentine leukocidin gene. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(8):766-71.
41. Aliberti S, Reyes LF, Faverio P, Sotgiu G, Dore S, Rodriguez AH, et al. Global initiative for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia (GLIMP): an international, observational cohort study. *The Lancet infectious diseases*. 2016;16(12):1364-76.
42. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Pseudomonas* y bacterias relacionadas. *Microbiología Médica*. 6ª ed. St. Louis: Mosby; 2009. p. 323-41.
43. Valles J, Mariscal D. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2005;23 Suppl 3:30-6.
44. Zilberberg MD, Shorr AF. Ventilator-associated pneumonia: the clinical pulmonary infection score as a surrogate for diagnostics and outcome. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;51 Suppl 1:S131-5.
45. Campbell S, Forbes BA. The Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(9 Suppl):S30-S3.
46. Ogston A. Micrococcus Poisoning. *Journal of anatomy and physiology*. 1882;17(1):24-58.
47. De Vos P, Garrity G, Jones D, R Krieg N, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes*. 2nd ed. New York,2009.
48. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino P. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2014;61(1):28-40.
49. Maayan-Metzger A, Strauss T, Rubin C, Jaber H, Dulitzky M, Reiss-Mandel A, et al. Clinical evaluation of early acquisition of *Staphylococcus aureus* carriage by newborns. *International Journal of Infectious Diseases*. 2017;64:9-14.
50. Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PloS one*. 2010;5(5):e10598.
51. Mehraj J, Witte W, Akmatov MK, Layer F, Werner G, Krause G. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *Current topics in microbiology and immunology*. 2016;398:55-87.
52. Price A, Sarween N, Gupta I, Baharani J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* screening in a cohort of haemodialysis patients: carriage, demographics and outcomes. *The Journal of hospital infection*. 2015;90(1):22-7.
53. Sollid JU, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M. *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;21:531-41.
54. Rodríguez Tamayo EA, Jiménez Quiceno JN. Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. *Iatreia*. 2015;28:66-77.
55. Popovich KJ, Hota B, Aroutcheva A, Kurien L, Patel J, Lyles-Banks R, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization burden in HIV-infected patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;56(8):1067-74.
56. Wu CJ, Ko WC, Ho MW, Lin HH, Yang YL, Lin JN, et al. Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among human immunodeficient virus-infected outpatients in Taiwan: oral *Candida* colonization as a comparator. *Journal of oral microbiology*. 2017;9(1):1322446.

57. Dahlman D, Jalalvand F, Blome MA, Hakansson A, Janson H, Quick S, et al. High Perineal and Overall Frequency of *Staphylococcus aureus* in People Who Inject Drugs, Compared to Non-Injectors. *Current microbiology*. 2017;74(2):159-67.
58. Leibler JH, León C, Cardoso LJP, Morris JC, Miller NS, Nguyen DD, et al. Prevalence and risk factors for MRSA nasal colonization among persons experiencing homelessness in Boston, MA. *Journal of medical microbiology*. 2017;66(8):1183-8.
59. Mehraj J, Akmatov MK, Strompl J, Gatzemeier A, Layer F, Werner G, et al. Methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a random sample of non-hospitalized adult population in northern Germany. *PLoS one*. 2014;9(9):e107937.
60. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(3):603-61.
61. Camarena J, Sánchez R. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>.
62. Sakoulas G, Moellering RC, Jr., Eliopoulos GM. Adaptation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;42 Suppl 1:S40-50.
63. Weist K, Hogberg LD. ECDC publishes 2015 surveillance data on antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in Europe. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(46).
64. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine*. 1998;339(8):520-32.
65. Rooijackers SH, Ruyken M, van Roon J, van Kessel KP, van Strijp JA, van Wamel WJ. Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Cellular microbiology*. 2006;8(8):1282-93.
66. Surewaard BG, de Haas CJ, Vervoort F, Rigby KM, DeLeo FR, Otto M, et al. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. *Cellular microbiology*. 2013;15(8):1427-37.
67. Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler AC, Schafer D, Chatterjee SS, et al. Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins. *Cellular microbiology*. 2014;16(4):451-65.
68. Stemerding AM, Kohl J, Pandey MK, Kuipers A, Leusen JH, Boross P, et al. *Staphylococcus aureus* formyl peptide receptor-like 1 inhibitor (FLIPr) and its homologue FLIPr-like are potent FcγR antagonists that inhibit IgG-mediated effector functions. *Journal of immunology*. 2013;191(1):353-62.
69. Balasubramanian D, Schnepfer L, Kumari H, Mathee K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic acids research*. 2013;41(1):1-20.
70. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(4):582-610.
71. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of infectious diseases*. 1983;5(2):279-313.
72. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*. 1998;4(4):551-60.
73. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007;67(3):351-68.
74. Cantón R, Fernández Olmos A, de la Pedrosa EGG, Del Campo R, Antonia Meseguer M. Infección bronquial crónica: el problema de *Pseudomonas aeruginosa*. *Archivos de bronconeumología*. 2011;47(Supplement 6):8-13.
75. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals:

- results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. International journal of antimicrobial agents. 2014;43(4):328-34.
76. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and disease. 2013;67(3):159-73.
77. Belon C, Soscia C, Bernut A, Laubier A, Bleves S, Blanc-Potard AB. A Macrophage Subversion Factor Is Shared by Intracellular and Extracellular Pathogens. PLoS pathogens. 2015;11(6):e1004969.
78. Elias S, Banin E. Multi-species *biofilms*: living with friendly neighbors. FEMS microbiology reviews. 2012;36(5):990-1004.
79. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus biofilms*. Journal of bacteriology. 2004;186(6):1838-50.
80. Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in *biofilm* formation and infection. International journal of medical microbiology : IJMM. 2006;296(2-3):133-9.
81. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus biofilms*: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence. 2011;2(5):445-59.
82. de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Fernandez L, Hancock RE. Bacterial *biofilm* development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. Current opinion in microbiology. 2013;16(5):580-9.
83. Singh R, Ray P. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. Future microbiology. 2014;9(5):669-81.
84. Otto M. Staphylococcal *biofilms*. Current topics in microbiology and immunology. 2008;322:207-28.
85. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of *biofilm* maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annual review of medicine. 2013;64:175-88.
86. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. *Biofilm* formation as microbial development. Annual review of microbiology. 2000;54:49-79.
87. Joo HS, Otto M. Molecular basis of *in vivo biofilm* formation by bacterial pathogens. Chemistry & biology. 2012;19(12):1503-13.
88. Lacoma A, Cano V, Moranta D, Regueiro V, Dominguez-Villanueva D, Laabei M, et al. Investigating intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* within a murine alveolar macrophage cell line. Virulence. 2017:1-15.
89. Jubrail J, Morris P, Bewley MA, Stoneham S, Johnston SA, Foster SJ, et al. Inability to sustain intraphagolysosomal killing of *Staphylococcus aureus* predisposes to bacterial persistence in macrophages. Cellular microbiology. 2016;18(1):80-96.
90. Li C, Wu Y, Riehle A, Ma J, Kamler M, Gulbins E, et al. *Staphylococcus aureus* Survives in Cystic Fibrosis Macrophages, Forming a Reservoir for Chronic Pneumonia. Infection and immunity. 2017;85(5).
91. Thwaites GE, Gant V. Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? Nat Rev Microbiol. 2011;9(3):215-22.
92. Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nature reviews Microbiology. 2009;7(5):355-66.
93. Loffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. International journal of medical microbiology : IJMM. 2014;304(2):170-6.
94. Li C, Wu Y, Riehle A, Ma J, Kamler M, Gulbins E, et al. *Staphylococcus aureus* survives in cystic fibrosis macrophages forming a reservoir for chronic pneumonia. Infection and immunity. 2017.
95. Buyck JM, Tulkens PM, Van Bambeke F. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activity of antibiotics towards *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a model of THP-1 human monocytes. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;57(5):2310-8.
96. Sana TG, Baumann C, Merdes A, Soscia C, Rattei T, Hachani A, et al. Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. mBio. 2015;6(3):e00712.

97. van Kessel KP, Bestebroer J, van Strijp JA. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in immunology*. 2014;5:467.
98. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Volker W, Heitmann V, Niemann S, et al. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO molecular medicine*. 2011;3(3):129-41.
99. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, et al. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PloS one*. 2008;3(1):e1409.
100. Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaire S, Tulkens PM. Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: current views and perspectives. *Current opinion in drug discovery & development*. 2006;9(2):218-30.
101. Krut O, Sommer H, Kronke M. Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;53(2):167-73.
102. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental biology*. 2005;21:319-46.
103. Tomasz A, Hotchkiss RD. Regulation of the Transformability of Pneumococcal Cultures by Macromolecular Cell Products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1964;51:480-7.
104. Tomasz A. Control of the competent state in Pneumococcus by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature*. 1965;208(5006):155-9.
105. Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of bacteriology*. 1970;104(1):313-22.
106. Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological reviews*. 1979;43(4):496-518.
107. Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(11):1620-5.
108. Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annual review of genetics*. 2008;42:541-64.
109. Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM, Finlay BB. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*. 2010;156(Pt 8):2271-82.
110. Antunes LC, Ferreira RB. Intercellular communication in bacteria. *Critical reviews in microbiology*. 2009;35(2):69-80.
111. Haag AF, Bagnoli F. The Role of Two-Component Signal Transduction Systems in *Staphylococcus aureus* Virulence Regulation. *Current topics in microbiology and immunology*. 2017;409:145-98.
112. Priest NK, Rudkin JK, Feil EJ, van den Elsen JM, Cheung A, Peacock SJ, et al. From genotype to phenotype: can systems biology be used to predict *Staphylococcus aureus* virulence? *Nature reviews Microbiology*. 2012;10(11):791-7.
113. Bronner S, Monteil H, Prevost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS microbiology reviews*. 2004;28(2):183-200.
114. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:12.
115. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular microbiology*. 2003;48(6):1429-49.
116. Fournier B, Hooper DC. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 2000;182(14):3955-64.
117. Fournier B, Klier A, Rapoport G. The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*. 2001;41(1):247-61.

118. Throup JP, Zappacosta F, Lunsford RD, Annan RS, Carr SA, Lonsdale JT, et al. The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry*. 2001;40(34):10392-401.
119. Brunskill EW, Bayles KW. Identification of *LytSR*-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 1996;178(19):5810-2.
120. Bose JL, Daly SM, Hall PR, Bayles KW. Identification of the *Staphylococcus aureus* *vfrAB* operon, a novel virulence factor regulatory locus. *Infection and immunity*. 2014;82(5):1813-22.
121. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, et al. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *Journal of bacteriology*. 2001;183(24):7341-53.
122. Wright JS, 3rd, Traber KE, Corrigan R, Benson SA, Musser JM, Novick RP. The *agr* radiation: an early event in the evolution of staphylococci. *Journal of bacteriology*. 2005;187(16):5585-94.
123. Geisinger E, Chen J, Novick RP. Allele-dependent differences in quorum-sensing dynamics result in variant expression of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 2012;194(11):2854-64.
124. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Molecular & general genetics : MGG*. 1986;202(1):58-61.
125. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 1988;170(9):4365-72.
126. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TH, Khan BA, Sturdevant DE, et al. RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular cell*. 2008;32(1):150-8.
127. Papenfort K, Corcoran C, Sk G, Heidrich N, Chao Y, Fröhlich K, et al. The role of sRNAs in virulence regulation 2013.
128. Felden B, Vandenesch F, Bouloc P, Romby P. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS pathogens*. 2011;7(3):e1002006.
129. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Hechard Y. delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides*. 2009;30(4):817-23.
130. Kavanaugh JS, Horswill AR. Impact of Environmental Cues on Staphylococcal Quorum Sensing and *Biofilm* Development. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(24):12556-64.
131. Khan BA, Yeh AJ, Cheung GY, Otto M. Investigational therapies targeting quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Expert opinion on investigational drugs*. 2015;24(5):689-704.
132. Ji G, Beavis R, Novick RP. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*. 1997;276(5321):2027-30.
133. Gray B, Hall P, Gresham H. Targeting *agr*- and *agr*-like quorum sensing systems for development of common therapeutics to treat multiple gram-positive bacterial infections. *Sensors*. 2013;13(4):5130-66.
134. Peterson MM, Mack JL, Hall PR, Alsup AA, Alexander SM, Sully EK, et al. Apolipoprotein B is an innate barrier against invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Cell host & microbe*. 2008;4(6):555-66.
135. Hall PR, Elmore BO, Spang CH, Alexander SM, Manifold-Wheeler BC, Castleman MJ, et al. Nox2 modification of LDL is essential for optimal apolipoprotein B-mediated control of *agr* type III *Staphylococcus aureus* quorum-sensing. *PLoS pathogens*. 2013;9(2):e1003166.
136. Manifold-Wheeler BC, Elmore BO, Triplett KD, Castleman MJ, Otto M, Hall PR. Serum Lipoproteins Are Critical for Pulmonary Innate Defense against *Staphylococcus aureus* Quorum Sensing. *Journal of immunology*. 2016;196(1):328-35.
137. Balaban N, Goldkorn T, Gov Y, Hirshberg M, Koyfman N, Matthews HR, et al. Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating Protein (TRAP). *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(4):2658-67.

138. Korem M, Sheoran AS, Gov Y, Tzipori S, Borovok I, Balaban N. Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. FEMS microbiology letters. 2003;223(2):167-75.
139. Morrison JM, Anderson KL, Beenken KE, Smeltzer MS, Dunman PM. The staphylococcal accessory regulator, SarA, is an RNA-binding protein that modulates the mRNA turnover properties of late-exponential and stationary phase *Staphylococcus aureus* cells. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2012;2:26.
140. Bischoff M, Dunman P, Kormanec J, Macapagal D, Murphy E, Mounts W, et al. Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* sigmaB regulon. Journal of bacteriology. 2004;186(13):4085-99.
141. Cheung AL, Eberhardt KJ, Chung E, Yeaman MR, Sullam PM, Ramos M, et al. Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. The Journal of clinical investigation. 1994;94(5):1815-22.
142. Roux A, Payne SM, Gilmore MS. Microbial telesensing: probing the environment for friends, foes, and food. Cell host & microbe. 2009;6(2):115-24.
143. Park SY, Chong YP, Park HJ, Park KH, Moon SM, Jeong JY, et al. agr Dysfunction and persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with removed eradicable foci. Infection. 2013;41(1):111-9.
144. Painter KL, Krishna A, Wigneshweraraj S, Edwards AM. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? Trends in microbiology. 2014;22(12):676-85.
145. Schweizer ML, Furuno JP, Sakoulas G, Johnson JK, Harris AD, Shardell MD, et al. Increased mortality with accessory gene regulator (agr) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(3):1082-7.
146. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. The Journal of infectious diseases. 2000;182(6):1688-93.
147. Paulander W, Nissen Varming A, Baek KT, Haaber J, Frees D, Ingmer H. Antibiotic-mediated selection of quorum-sensing-negative *Staphylococcus aureus*. mBio. 2013;3(6):e00459-12.
148. Musser JM, Schlievert PM, Chow AW, Ewan P, Kreiswirth BN, Rosdahl VT, et al. A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990;87(1):225-9.
149. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infection and immunity. 2002;70(2):631-41.
150. Bhatti M, Ray P, Singh R, Jain S, Sharma M. Presence of virulence determinants amongst *Staphylococcus aureus* isolates from nasal colonization, superficial & invasive infections. The Indian journal of medical research. 2013;138:143-6.
151. Moore PC, Lindsay JA. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. Journal of clinical microbiology. 2001;39(8):2760-7.
152. von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2004;49(3):157-62.
153. Fischer J, Lee JC, Peters G, Kahl BC. Acapsular clinical *Staphylococcus aureus* isolates lack agr function. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2014;20(7):O414-7.
154. Holtfreter S, Grumann D, Schmutde M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B, et al. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Journal of clinical microbiology. 2007;45(8):2669-80.
155. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous

- vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(1):99-139.
156. Viedma E, Sanz F, Orellana MA, San Juan R, Aguado JM, Otero JR, et al. Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(1):51-8.
157. Rudkin JK, Laabei M, Edwards AM, Joo HS, Otto M, Lennon KL, et al. Oxacillin alters the toxin expression profile of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(2):1100-7.
158. Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(7):1524-32.
159. Cameron DR, Howden BP, Peleg AY. The interface between antibiotic resistance and virulence in *Staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(6):576-82.
160. Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal *biofilm* disassembly. *Trends in microbiology*. 2011;19(9):449-55.
161. Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of bacteriology*. 2003;185(7):2066-79.
162. Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature reviews Microbiology*. 2016;14(9):576-88.
163. Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2012;76(1):46-65.
164. Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. In vivo and In vitro Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus spp.* *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:106.
165. Dubern JF, Diggle SP. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular bioSystems*. 2008;4(9):882-8.
166. Rampioni G, Falcone M, Heeb S, Frangipani E, Fletcher MP, Dubern JF, et al. Unravelling the Genome-Wide Contributions of Specific 2-Alkyl-4-Quinolones and PqsE to Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*. 2016;12(11):e1006029.
167. Ye L, Cornelis P, Guillemin K, Ballet S, Hammerich O. Structure revision of N-mercapto-4-formylcarbostyryl produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. *Natural product communications*. 2014;9(6):789-94.
168. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*. 2015;6(1):26-41.
169. Korgaonkar A, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M. Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(3):1059-64.
170. Qazi S, Middleton B, Muharram SH, Cockayne A, Hill P, O'Shea P, et al. N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*. 2006;74(2):910-9.
171. Michelsen CF, Christensen AM, Bojer MS, Hoiby N, Ingmer H, Jelsbak L. *Staphylococcus aureus* alters growth activity, autolysis, and antibiotic tolerance in a human host-adapted *Pseudomonas aeruginosa* lineage. *Journal of bacteriology*. 2014;196(22):3903-11.
172. Filkins LM, Graber JA, Olson DG, Dolben EL, Lynd LR, Bhuju S, et al. Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* Drives *S. aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. *Journal of bacteriology*. 2015;197(14):2252-64.

173. Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species *biofilms*: how to avoid unfriendly neighbors. FEMS microbiology reviews. 2012;36(5):972-89.
174. Kumar A, Ting YP. Presence of *Pseudomonas aeruginosa* influences *biofilm* formation and surface protein expression of *Staphylococcus aureus*. Environmental microbiology. 2015;17(11):4459-68.
175. Limoli DH, Whitfield GB, Kitao T, Ivey ML, Davis MR, Jr., Grahl N, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Overproduction Promotes Coexistence with *Staphylococcus aureus* in a Model of Cystic Fibrosis Respiratory Infection. mBio. 2017;8(2).
176. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. Lancet. 1974;2(7872):81-4.
177. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. Critical care medicine. 1985;13(10):818-29.
178. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. Annals of internal medicine. 2002;137(10):791-7.
179. Ferrando C, Soro M, Canet J, Unzueta MC, Suarez F, Librero J, et al. Rationale and study design for an individualized perioperative open lung ventilatory strategy (iPROVE): study protocol for a randomized controlled trial. Trials. 2015;16:193.
180. Fowler VG, Jr., Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, Cabell CH, et al. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. The Journal of infectious diseases. 2004;190(6):1140-9.
181. Niederman MS. Hospital-acquired pneumonia, health care-associated pneumonia, ventilator-associated pneumonia, and ventilator-associated tracheobronchitis: definitions and challenges in trial design. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010;51 Suppl 1:S12-7.
182. Duthie ES, Lorenz LL. Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. Journal of general microbiology. 1952;6(1-2):95-107.
183. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. The EMBO journal. 1993;12(10):3967-75.
184. Finck-Barbancon V, Prevost G, Piemont Y. Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. Research in microbiology. 1991;142(1):75-85.
185. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2006;367(9512):731-9.
186. Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW, Jr. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1973;3(3):418-24.
187. Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(24):14339-44.
188. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI document M07-A9. Approved Standard-Ninth ed. Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
189. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100-S27. 27th ed. Waive, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
190. Monecke S, Jatzwauk L, Weber S, Slickers P, Ehricht R. DNA microarray-based genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Eastern Saxony. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008;14(6):534-45.

191. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008;53(2):237-51.
192. Traber K, Novick R. A slipped-mispairing mutation in AgrA of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of agr and failure to translate delta- and alpha-haemolysins. *Molecular microbiology*. 2006;59(5):1519-30.
193. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology*. 2008;154(Pt 8):2265-74.
194. Elek SD, Levy E. Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1950;62(4):541-54.
195. Laabei M, Jamieson WD, Massey RC, Jenkins AT. *Staphylococcus aureus* interaction with phospholipid vesicles--a new method to accurately determine accessory gene regulator (agr) activity. *PloS one*. 2014;9(1):e87270.
196. Zhou J, Loftus AL, Mulley G, Jenkins AT. A thin film detection/response system for pathogenic bacteria. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(18):6566-70.
197. Gomes-Fernandes M, Laabei M, Pagan N, Hidalgo J, Molinos S, Villar Hernandez R, et al. Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. *PloS one*. 2017;12(4):e0175552.
198. Kwasny SM, Opperman TJ. Static *biofilm* cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-*biofilm* drug discovery. *Current protocols in pharmacology / editorial board, SJ Enna*. 2010;Chapter 13:Unit 13A 8.
199. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and Analyzing Static *Biofilms*. *Current protocols in microbiology*. 2011:1B..-B..18.
200. Tolker-Nielsen T, Sternberg C. Growing and analyzing *biofilms* in flow chambers. *Current protocols in microbiology*. 2011;Chapter 1:Unit 1B 2.
201. Rzhepishevskaya O, Hakobyan S, Ruhel R, J. G, Barbero D, Ramstedt M. The surface charge of anti-bacterial coatings alters motility and *biofilm* architecture. *Biomater Sci*. 2013;1:589-602
202. Zhu J, Chai Y, Zhong Z, Li S, Winans SC. Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(11):6949-53.
203. Steindler L, Venturi V. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS microbiology letters*. 2007;266(1):1-9.
204. Parker D, Prince A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *Seminars in immunopathology*. 2012;34(2):281-97.
205. Stulik L, Malafa S, Hudcova J, Rouha H, Henics BZ, Craven DE, et al. alpha-Hemolysin activity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* predicts ventilator-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;190(10):1139-48.
206. Aliberti S, Reyes LF, Faverio P, Sotgiu G, Dore S, Rodriguez AH, et al. Global initiative for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia (GLIMP): an international, observational cohort study. *The Lancet infectious diseases*. 2016;16(12):1364-76.
207. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, Johannes RS. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest*. 2005;128(6):3854-62.
208. Argudin MA, Mendoza MC, Mendez FJ, Martin MC, Guerra B, Rodicio MR. Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(7):2097-105.
209. Argudin MA, Argumosa V, Mendoza MC, Guerra B, Rodicio MR. Population structure and exotoxin gene content of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Spanish healthy carriers. *Microbial pathogenesis*. 2013;54:26-33.
210. Berube BJ, Bubeck-Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*. 2013;5(6):1140-66.

211. Salgado-Pabón W, Herrera A, Vu BG, Stach CS, Merriman JA, Spaulding AR, et al. *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -toxin Production is Common in Strains With the  $\beta$ -toxin Gene Inactivated by Bacteriophage. *The Journal of infectious diseases*. 2014;210(5):784-92.
212. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(1):49-62.
213. Garzón JR, Cuervo M S, Gómez R J, Cortés JA. Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: a propósito de pacientes con neutropenia y fiebre. *Revista chilena de infectología*. 2011;28:537-45.
214. Quintiliani R, Sr., Quintiliani R, Jr. Pharmacokinetics/Pharmacodynamics for critical care clinicians. *Critical care clinics*. 2008;24(2):335-48, xi.
215. Molina F, González M, Guerra A, Muñoz F, Mendoza R. Farmacocinética y farmacodinamia de los antibióticos en el paciente críticamente enfermo. Primera parte. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*. 2016;16(2):95-101.
216. Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends in microbiology*. 2009;17(2):59-65.
217. Stulik L, Hudcova J, Craven DE, Nagy G, Nagy E. Low Efficacy of Antibiotics Against *Staphylococcus aureus* Airway Colonization in Ventilated Patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017;64(8):1081-8.
218. Cigana C, Bianconi I, Baldan R, De Simone M, Riva C, Sipione B, et al. *Staphylococcus aureus* impacts *Pseudomonas aeruginosa* chronic respiratory disease in murine models. *The Journal of infectious diseases*. 2017:jix621.
219. de Dios Caballero J, Vida R, Cobo M, Maiz L, Suarez L, Galeano J, et al. Individual Patterns of Complexity in Cystic Fibrosis Lung Microbiota, Including Predator Bacteria, over a 1-Year Period. *mBio*. 2017;8(5).
220. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(12):827-35.
221. Cohen TS, Hilliard JJ, Jones-Nelson O, Keller AE, O'Day T, Tkaczyk C, et al. *Staphylococcus aureus* alpha toxin potentiates opportunistic bacterial lung infections. *Science translational medicine*. 2016;8(329):329ra31.
222. Goerke C, Wirtz C, Flückiger U, Wolz C. Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection. *Molecular microbiology*. 2006;61(6):1673-85.
223. Jin T, Bokarewa M, McIntyre L, Tarkowski A, Corey GR, Reller LB, et al. Fatal outcome of bacteraemic patients caused by infection with staphylokinase-deficient *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of medical microbiology*. 2003;52(Pt 10):919-23.
224. Sause WE, Buckley PT, Strohl WR, Lynch AS, Torres VJ. Antibody-Based Biologics and Their Promise to Combat *Staphylococcus aureus* Infections. *Trends in pharmacological sciences*. 2016;37(3):231-41.
225. Ross RA, Onderdonk AB. Production of toxic shock syndrome toxin 1 by *Staphylococcus aureus* requires both oxygen and carbon dioxide. *Infection and immunity*. 2000;68(9):5205-9.
226. Cramton SE, Ulrich M, Gotz F, Doring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity*. 2001;69(6):4079-85.
227. Seidl K, Chen L, Bayer AS, Hady WA, Kreiswirth BN, Xiong YQ. Relationship of agr expression and function with virulence and vancomycin treatment outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(12):5631-9.
228. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(10):667-73.

229. Heyer G, Saba S, Adamo R, Rush W, Soong G, Cheung A, et al. *Staphylococcus aureus* agr and sarA functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung. *Infection and immunity*. 2002;70(1):127-33.
230. Abdelnour A, Arvidson S, Bremell T, Ryden C, Tarkowski A. The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infection and immunity*. 1993;61(9):3879-85.
231. Gillaspay AF, Hickmon SG, Skinner RA, Thomas JR, Nelson CL, Smeltzer MS. Role of the accessory gene regulator (agr) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infection and immunity*. 1995;63(9):3373-80.
232. Booth MC, Cheung AL, Hatter KL, Jett BD, Callegan MC, Gilmore MS. Staphylococcal accessory regulator (sar) in conjunction with agr contributes to *Staphylococcus aureus* virulence in endophthalmitis. *Infection and immunity*. 1997;65(4):1550-6.
233. Schwan WR, Langhorne MH, Ritchie HD, Stover CK. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus* agr mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2003;38(1):23-8.
234. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:1174.
235. Chaffin DO, Taylor D, Skerrett SJ, Rubens CE. Changes in the *Staphylococcus aureus* transcriptome during early adaptation to the lung. *PloS one*. 2012;7(8):e41329.
236. Giese B, Glowinski F, Paprotka K, Dittmann S, Steiner T, Sinha B, et al. Expression of delta-toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of beta-toxin. *Cellular microbiology*. 2011;13(2):316-29.
237. Munzenmayer L, Geiger T, Daiber E, Schulte B, Autenrieth SE, Fraunholz M, et al. Influence of Sae and Agr regulated factors on the escape of *Staphylococcus aureus* from human macrophages. *Cellular microbiology*. 2016;18(8):1172-83.
238. Malachowa N, Whitney AR, Kobayashi SD, Sturdevant DE, Kennedy AD, Braughton KR, et al. Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood. *PloS one*. 2011;6(4):e18617.
239. Laabei M, Uhlemann AC, Lowy FD, Austin ED, Yokoyama M, Ouadi K, et al. Evolutionary Trade-Offs Underlie the Multi-faceted Virulence of *Staphylococcus aureus*. *PLoS biology*. 2015;13(9):e1002229.
240. Kang CK, Kim YK, Jung SI, Park WB, Song KH, Park KH, et al. agr functionality affects clinical outcomes in patients with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2017;36(11):2187-91.
241. Smyth DS, Kafer JM, Wasserman GA, Velickovic L, Mathema B, Holzman RS, et al. Nasal carriage as a source of agr-defective *Staphylococcus aureus* bacteremia. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(8):1168-77.
242. Lilje B, Rasmussen RV, Dahl A, Stegger M, Skov RL, Fowler VG, et al. Whole-genome sequencing of bloodstream *Staphylococcus aureus* isolates does not distinguish bacteraemia from endocarditis. *Microbial genomics*. 2017;3(11).
243. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr., Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, et al. Accessory gene regulator (agr) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(5):1492-502.
244. Viedma E, Perez-Montarelo D, Villa J, Munoz-Gallego I, Larrosa N, Fernandez-Hidalgo N, et al. Sub-inhibitory concentrations of oxacillin modify the expression of agr locus in *Staphylococcus aureus* clinical strains belonging to different clonal complexes. *BMC infectious diseases*. 2018;18(1):177.
245. Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, et al. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. The Journal of infectious diseases. 2012;205(5):798-806.
246. de Sanctis JT, Swami A, Sawarynski K, Gerasymchuk L, Powell K, Robinson-Dunn B, et al. Is there a clinical association of vancomycin MIC creep, agr group II locus, and treatment failure in MRSA bacteremia? Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B. 2011;20(3):184-8.
247. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nature reviews Microbiology. 2006;4(4):295-305.
248. Kahl BC. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*--a bacterial survival strategy. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2014;21:515-22.
249. Yarwood JM, Paquette KM, Tikh IB, Volper EM, Greenberg EP. Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms. Journal of bacteriology. 2007;189(22):7961-7.
250. Pratten J, Foster SJ, Chan PF, Wilson M, Nair SP. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within *biofilms* and effect on adhesion. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2001;3(8):633-7.
251. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Demelio V, Spina D, Nicoletti G, et al. agr-Genotyping and transcriptional analysis of *biofilm*-producing *Staphylococcus aureus*. FEMS immunology and medical microbiology. 2007;51(1):220-7.
252. Nienaber JJ, Sharma Kuinkel BK, Clarke-Pearson M, Lamlertthon S, Park L, Rude TH, et al. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. The Journal of infectious diseases. 2011;204(5):704-13.
253. Deurenberg RH, Rijnders MI, Sebastian S, Welling MA, Beisser PS, Stobberingh EE. The *Staphylococcus aureus* lineage-specific markers collagen adhesin and toxic shock syndrome toxin 1 distinguish multilocus sequence typing clonal complexes within spa clonal complexes. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2009;65(2):116-22.
254. Lozano C, Gomez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. International journal of medical microbiology : IJMM. 2011;301(6):500-5.
255. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S, et al. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(52):19890-5.
256. Kessler E, Safrin M, Olson JC, Ohman DE. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. The Journal of biological chemistry. 1993;268(10):7503-8.
257. Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S, Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established *biofilms* produced by *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology. 2009;155(Pt 7):2148-56.
258. Korgaonkar AK, Whiteley M. *Pseudomonas aeruginosa* enhances production of an antimicrobial in response to N-acetylglucosamine and peptidoglycan. Journal of bacteriology. 2011;193(4):909-17.
259. Park JH, Lee JH, Cho MH, Herzberg M, Lee J. Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal. FEMS microbiology letters. 2012;335(1):31-8.
260. Stacy A, McNally L, Darch SE, Brown SP, Whiteley M. The biogeography of polymicrobial infection. Nature reviews Microbiology. 2016;14(2):93-105.
261. DeLeon S, Clinton A, Fowler H, Everett J, Horswill AR, Rumbaugh KP. Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound model. Infection and immunity. 2014;82(11):4718-28.

262. Mitchell G, Seguin DL, Asselin AE, Deziel E, Cantin AM, Frost EH, et al. *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and *biofilm* production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. BMC microbiology. 2010;10:33.
263. Chew SC, Kundukad B, Seviour T, van der Maarel JR, Yang L, Rice SA, et al. Dynamic remodeling of microbial *biofilms* by functionally distinct exopolysaccharides. mBio. 2014;5(4):e01536-14.
264. Urbano R, Karlinsey JE, Libby SJ, Doulias PT, Ischiropoulos H, Warheit-Niemi HI, et al. Host Nitric Oxide Disrupts Microbial Cell-to-Cell Communication to Inhibit Staphylococcal Virulence. Cell host & microbe. 2018.
265. Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2016;35(12):1923-31.
266. Elasri MO, Thomas JR, Skinner RA, Blevins JS, Beenken KE, Nelson CL, et al. *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. Bone. 2002;30(1):275-80.
267. Garcia-Betancur JC, Goni-Moreno A, Horger T, Schott M, Sharan M, Eikmeier J, et al. Cell differentiation defines acute and chronic infection cell types in *Staphylococcus aureus*. eLife. 2017;6.
268. Valour F, Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Gagnaire J, Bouaziz A, Karsenty J, et al. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and *biofilm* formation. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2015;21(6):568 e1-11.
269. Mashburn LM, Jett AM, Akins DR, Whiteley M. *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. Journal of bacteriology. 2005;187(2):554-66.
270. Sriramulu DD, Lunsdorf H, Lam JS, Romling U. Microcolony formation: a novel *biofilm* model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. Journal of medical microbiology. 2005;54(Pt 7):667-76.
271. Kavanaugh NL, Zhang AQ, Nobile CJ, Johnson AD, Ribbeck K. Mucins suppress virulence traits of *Candida albicans*. mBio. 2014;5(6):e01911.
272. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. Chest. 2009;135(2):505-12.
273. Orazi G, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* Alters *Staphylococcus aureus* Sensitivity to Vancomycin in a *Biofilm* Model of Cystic Fibrosis Infection. mBio. 2017;8(4).
274. Radlinski L, Rowe SE, Kartchner LB, Maile R, Cairns BA, Vitko NP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts determine antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*. PLoS biology. 2017;15(11):e2003981.
275. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of *biofilm* in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of *biofilm* production by staphylococci. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2007;115(8):891-9.
276. Tremblay J, Deziel E. Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. Journal of basic microbiology. 2008;48(6):509-15.
277. OpenWetWare. AB medium: OpenWetWare; [updated 11 October 2012 13:44 UTC]. Available from: [https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=AB\\_medium&oldid=634648](https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=AB_medium&oldid=634648).
278. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, et al. Role of autolysin-mediated DNA release in *biofilm* formation of *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology. 2007;153(Pt 7):2083-92.

1 **Persistent isolation of *Staphylococcus aureus* in mechanically-ventilated patients: impact of**  
2 **host-pathogen factors on outcome.**

3

4 **Keywords.** *Staphylococcus aureus*, mechanical ventilation, tracheobronchitis, persistence,  
5 bronchial colonization, pneumonia

6

7 **Dear editor:**

8 Lungs represent the major site of infection in the intensive care unit (ICU) (1). Bacteria  
9 recovered from patients undergoing mechanical ventilation (MV) can be part of the resident  
10 microbiome so its role as causative agents is still an unresolved issue. Colonization may be  
11 persistent even when the clinical symptoms improve (2). *Staphylococcus aureus* remains a  
12 leading cause, both when methicillin susceptible (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA).  
13 Colonization at ICU admission is a risk factor for developing pneumonia (3, 4) but clinical  
14 features can range from asymptomatic carriage to severe invasive disease, demonstrating an  
15 adaptation and switch in virulence regulation (5). It is of paramount importance to distinguish  
16 colonization from infection and to adequately prescribe antimicrobials.

17 This was a retrospective and observational study conducted during 2 years (2012-2013).  
18 Patients on MV admitted at ICU were selected based on the isolation of *S.aureus* in  
19 endotracheal aspirate (ETA). The objectives were to investigate host and microbial factors  
20 associated with 1) clinical outcome and 2) persistent isolation despite treatment adjusted to  
21 antibiotic susceptibility profile.

22 ETA and blood cultures were performed when there was clinical suspicion of respiratory tract  
23 infection, not systematically. Nasal swabs were obtained to check MRSA carriage. Study was  
24 performed according to confidentiality criteria and dissociation of patients' identification data.

25 Data recorded included epidemiological features, presence of comorbidities, Glasgow Coma  
26 Scale (GCS), central nervous system (CNS) involvement and severity of illness at admission  
27 assessed by Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE)-II.

28 Patients (all with *S.aureus* ETA culture) were classified into pneumonia, tracheobronchitis or  
29 bronchial colonization by expert clinicians according to Clinical Pulmonary Infection Score  
30 (CPIS) and radiographic findings (6). Ventilator associated pneumonia was defined by presence  
31 of pulmonary infiltrate and CPIS  $\geq 6$ . Ventilator associated tracheobronchitis was defined when  
32 there were fever ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) with no other recognizable cause of purulent secretion and no  
33 radiographic signs of new pneumonia. Bronchial colonization was defined in the absence of the  
34 aforementioned clinical and radiological features. Data regarding antimicrobial therapy was  
35 recorded. Isolation in ETA was defined persistent when it lasted  $\geq 7$  days despite treatment  
36 adjusted to susceptibility profile.

37 Adverse clinical outcome was defined as the development of respiratory complications  
38 following definitions from Ferrando et al (7), including empyema and septic shock. When after  
39 initial improvement, there was need for acute changes in ventilator support to enhance  
40 oxygenation, the patient was also considered to have a respiratory complication. Mortality was  
41 also recorded. VAP might lead to prolonged ICU length of stay (LOS) and prolonged MV so  
42 these parameters were also analyzed to define outcome. Clinical strains were phenotypically  
43 characterized by conventional identification and susceptibility testing methods. Antimicrobial  
44 treatment prescribed was recorded, and categorized as  $\beta$ -lactams, vancomycin, quinolones  
45 and linezolid.

46 Pearson's chi-square or Fisher test was applied for categorical variables and student's T test or  
47 ANOVA for numerical variables. Univariate/multivariate analyses were performed. Variables  
48 included in multivariate models were selected according to the univariate analysis results.  
49 Associations were considered statistically significant if  $p < 0.05$ . Data were analyzed with SPSS  
50 v15 (SPSS Inc, Chicago, IL).

51

52 During the study period, the global incidence of VAP was 1.61 cases for 1000 days of stay and  
53 2.34 cases for 1000 days of MV. Of the 3012 ETA samples collected, *S.aureus* was isolated in

54 270 (9%) corresponding to 121 patients classified as: pneumonia(27), tracheobronchitis(45)  
55 and bronchial colonization(49). Patients' epidemiological and clinical characteristics and  
56 comparisons according to the study group are shown in table 1. Among the 27 patients with  
57 pneumonia diagnosis, chest X-ray results were as follows; 13 cases were unilobar (48.2%), 12  
58 multilobar (44.4%) and 2 had a diffuse pulmonary infiltrate (7.4%). Vascular or traumatic CNS  
59 involvement was frequent (42.1%) (previously described risk factor for *S.aureus* colonization).  
60 None of the variables allowed a satisfactory distinction between groups.

61 Initial *S.aureus* isolation was mixed with another microorganism in 35.5% of cases:  
62 *Haemophilus influenzae* (16.3%), *Pseudomonas aeruginosa* (14%) and other Gram negative  
63 bacilli (58.1%). *P.aeruginosa* was subsequently isolated in 30 patients (24.8%). Twenty-one  
64 patients (17.3%) had a positive blood culture, and in 9 cases, the isolated microorganism was  
65 *S.aureus* (7.4%).

66 Respiratory adverse clinical outcome, including mortality related was associated with diagnosis  
67 of pneumonia ( $p<0.001$ ) and staphylococcal bacteraemia ( $p=0.022$ ) in univariate analysis, and  
68 only pneumonia in multivariate ( $p= 0.001$ ; OR: 38.4; IC95%: 4.606-320.165). Interestingly,  
69 clinical outcome was similar regardless of cloxacillin resistance. No statistical differences were  
70 found when considering ICU LOS, days on MV, age, APACHE-II and GCS.

71 When considering global mortality, it accounted for 48 patients (39.7%), and 6 cases were  
72 staphylococcal infection related. Mortality was significantly associated with the presence of  
73 comorbidities ( $p=0.017$ ), positive *S.aureus* blood culture ( $p=0.028$ ), previous MRSA carriage  
74 ( $p=0.025$ ) and consecutive isolation of *P.aeruginosa* in respiratory sample ( $p=0.052$ ). Patients  
75 that died were older ( $p=0.004$ ) and had a higher APACHE index at admission ( $p< 0.001$ ).

76 Selecting the 97 patients that received antimicrobial treatment adjusted to susceptibility  
77 profile, persistence at  $\geq 7$ days was documented in 39 cases (40.2%), being 27 MSSA and 12  
78 MRSA. Persistence was frequent independently of the antimicrobial used ( $p=0.036$ ). In the  
79 univariate analysis, persistence correlated with: younger age ( $p=0.009$ ), higher CPIS ( $p=0.041$ ),

80 ICU LOS ( $p < 0.001$ ) and days on MV ( $p < 0.001$ ), cloxacillin resistance ( $p = 0.016$ ) and consecutive  
81 isolation of *P.aeruginosa* ( $p < 0.001$ ). In multivariate only age ( $p = 0.003$ ; OR: 0.949; IC 95%:  
82 0.918-0.982) and cloxacillin resistance ( $p = 0.003$ ; OR: 7.891; IC 95%: 1.980-31.454) remained  
83 significant. Correlation to younger age could be associated to differences in antibiotic  
84 pharmacokinetics/pharmacodynamics and inflammatory response. An important aspect is the  
85 absence of differences regarding clinical outcome, suggesting that persistence is more related  
86 to bacterial adaptation (2). Potential reasons for persistence could be a limited antimicrobial  
87 penetration into lung parenchyma, together with the ability of *S.aureus* to reside intracellularly  
88 within host cells and to produce biofilm (8). The impact of long-term effect of persistent  
89 bacterial isolation remains to be elucidated. Persistent isolation was more frequent in MRSA  
90 cases, as expected since antimicrobial treatments such as glycopeptides have poor penetration  
91 into alveolar tissues and less intrinsic activity than  $\beta$ -lactams (9). Still, MSSA isolates were also  
92 recovered from persistent cases indicating that cloxacillin resistance or type of antimicrobial  
93 are not the only factors intervening in this phenotype. Adequacy of treatment was considered  
94 according to the results of in-vitro susceptibility testing, but antimicrobial characteristics such  
95 as lung penetration, bactericidal/ bacteriostatic/ intracellular activity were not analysed.

96 *S.aureus* has a complex set of virulence factors, with defined implications in severity in  
97 community acquired infections but less clear in nosocomial (10). In recent years, preclinical  
98 investigations using monoclonal antibodies against virulence factors have shown promising  
99 results (11). Regulatory systems, such as the accessory gene regulator (*agr*) control virulence  
100 factors secretion and its dysfunction has been related to persistent bacteremia and higher  
101 mortality. However, we have previously shown that about 80% of isolates from the respiratory  
102 tract had a functional *agr* with no correlation with unfavourable outcome (12).

103 In summary, our study suggests that persistent *S.aureus* isolation despite adjusted antibiotic  
104 treatment is often reported in MV patients, with no correlation with adverse clinical outcome.  
105 Although it is more frequent in MRSA cases, it is also reported for MSSA isolates. Thus,

106 in order to optimize antimicrobial treatment, besides considering positive bacterial culture  
107 result it will also be important to identify microbial factors that contribute to virulence in order  
108 to initiate a highly-focused personalized therapy.

#### 109 **Funding**

110 This work has been funded by the project PI13/01418 which is part of "Plan Nacional de I+D +I"  
111 and co-funded by ISCIII- Subdirección General de Evaluación and "Fondo Europeo de  
112 Desarrollo Regional" (FEDER). This work also received a grant from the Spanish Society of  
113 Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR 054/2011). None of the funding sources had a role  
114 in study design, collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and  
115 in the decision to submit the article for publication.

116

#### 117 **Acknowledgements**

118 We thank Isabel Carrasco for her technical assistance and Maisem Laabei for his critical review.

119

#### 120 **Conflict of interest statement**

121 The authors have no conflict of interest, including specific financial interests or relationships or  
122 affiliations to the subject matter or materials discussed in the manuscript.

123

124 **REFERENCES**

- 125 1. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al.  
126 Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016  
127 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American  
128 Thoracic Society. Clin Infect Dis. 2016;63:e61-e111.
- 129 2. Prat C, Lacombe A. Bacteria in the respiratory tract-how to treat? Or do not treat?  
130 International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International  
131 Society for Infectious Diseases. 2016;51:113-22.
- 132 3. Paling FP, Wolkewitz M, Bode LG, Klein Klouwenberg PM, Ong DS, Depuydt P, et al.  
133 *Staphylococcus aureus* colonization at ICU admission as a risk factor for developing *S. aureus*  
134 ICU pneumonia. Clin Microbiol Infect. 2017;23:49 e9- e14.
- 135 4. Paling FP, Troeman DPR, Wolkewitz M, Kalyani R, Prins DR, Weber S, et al. Rationale and  
136 design of ASPIRE-ICU: a prospective cohort study on the incidence and predictors of  
137 *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the ICU. BMC Infect Dis.  
138 2017;17:643.
- 139 5. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. *Staphylococcus aureus*  
140 infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin  
141 Microbiol Rev. 2015;28:603-61.
- 142 6. Zilberberg MD, Shorr AF. Ventilator-associated pneumonia: the clinical pulmonary infection  
143 score as a surrogate for diagnostics and outcome. Clin Infect Dis. 2010;51 Suppl 1:S131-5.
- 144 7. Ferrando C, Soro M, Canet J, Unzueta MC, Suarez F, Librero J, et al. Rationale and study  
145 design for an individualized perioperative open lung ventilatory strategy (iPROVE): study  
146 protocol for a randomized controlled trial. Trials. 2015;16:193.
- 147 8. Lacombe A, Cano V, Moranta D, Regueiro V, Dominguez-Villanueva D, Laabei M, et al.  
148 Investigating intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* within a murine alveolar  
149 macrophage cell line. Virulence. 2017;8:1761-75.

- 150 9. Stulik L, Hudcova J, Craven DE, Nagy G, Nagy E. Low Efficacy of Antibiotics against  
151 *Staphylococcus aureus* Airway Colonization in Ventilated Patients. Clin Infect Dis. 2017.
- 152 10. Aliberti S, Reyes LF, Faverio P, Sotgiu G, Dore S, Rodriguez AH, et al. Global initiative for  
153 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia (GLIMP): an international, observational  
154 cohort study. The Lancet Infectious diseases. 2016;16:1364-76.
- 155 11. Sause WE, Buckley PT, Strohl WR, Lynch AS, Torres VJ. Antibody-Based Biologics and Their  
156 Promise to Combat *Staphylococcus aureus* Infections. Trends in pharmacological sciences.  
157 2016;37:231-41.
- 158 12. Gomes-Fernandes M, Laabei M, Pagan N, Hidalgo J, Molinos S, Villar Hernandez R, et al.  
159 Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower  
160 respiratory tract infections. PLoS One. 2017;12:e0175552.
- 161

162 **TABLES**

163 **Table 1.** Patients epidemiological and clinical characteristics; and comparisons according to the  
 164 study group considered.

165

Baseline variables	Colonization (n=49)	Tracheobronchitis (n=45)	Pneumonia (n=27)	P value
Age, y [mean (SD)]	59.7 (15.2)	57.9 (18.3)	60 (17.3)	0.833
Male, %	28 (57.1)	32 (71.1)	17 (63)	0.389
Origin				
Community-acquired	5 (10.4)	6 (13.3)	6 (22.2)	0.172
Nosocomial	43 (89.6)	37 (82.2)	19 (70.4)	
Health-Care related	-	2 (4.4)	2 (7.4)	
Presence of any comorbidity	36 (73.5)	33 (73.3)	22 (81.5)	0.713
Diabetes	15 (30.6)	11 (24.4)	7 (25.9)	0.809
Chronic respiratory disease	12 (24.5)	6 (13.3)	4 (14.8)	0.352
Neoplasia	8 (16.3)	9 (20)	6 (22.2)	0.835
Hypertension	20 (40.8)	14 (31.1)	7 (25.9)	0.389
Heart failure	7 (14.3)	8 (17.8)	2 (7.4)	0.500
Renal failure	3 (6.1)	2 (4.4)	-	0.541
Obesity	4 (8.2)	1 (2.2)	-	0.280
Renal transplant/ Immunosupression	2 (4.1)	-	3 (11.1)	0.056
Reason for ICU admission				
Medical	33 (67.3)	33 (73.3)	19 (70.4)	0.274
Trauma	4 (8.2)	1 (2.2)	5 (18.5)	
Scheduled surgery	9 (18.4)	9 (20)	3 (11.1)	
Urgent surgery	3 (6.1)	2 (4.4)	0 (0)	
APACHE-II [mean (SD)]	19.8 (8.6)	18.1 (7.9)	17.7 (6.9)	0.489
GLASGOW [mean (SD)]	9.8 (4.6)	10.2 (4.8)	10.4 (5.0)	0.831
CPIS [mean (SD)]	-	3.7 (1.3)	6.8 (1.4)	<0.001*
Vascular or traumatic CNS involvement	19 (38.8)	17 (37.8)	15 (55.6)	0.305
Ischemia	2 (4.1)	1 (2.2)	2 (7.4)	0.635
Bleeding	7 (14.3)	7 (15.6)	4 (14.8)	1
Head trauma	4 (8.2)	2 (4.4)	6 (22.2)	0.061
Other type of CNS involvement <sup>a</sup>	8 (16.3)	8 (17.8)	4 (14.8)	1
ICU length of stay, d [mean (SD)]	23 (22)	26.4 (24)	27.9 (23.1)	0.628
Ventilation, d [mean (SD)]	24 (22.2)	25.9 (23.7)	27.9 (23.2)	0.773
Mechanical ventilation until first <i>S.aureus</i> isolation, d [mean (SD)]	7.3 (8.8)	6.7 (7.3)	5.2 (9)	0.567
Persistent positive culture at 7 days	14 (48.3)	14 (34.1)	11 (40.7)	0.489
Global Mortality	21 (42.9)	20 (44.4)	7 (25.9)	0.264
Respiratory complications	1 (7.1)	1 (7.1)	12 (85.7)	<0.001*
Mortality related to the staphylococcal infection	2 (4.1)	-	4 (14.8)	0.018*
Positive <i>S.aureus</i> blood culture	3 (6.1)	2 (4.4)	4 (14.8)	0.324
Previous MRSA carriage	6 (12.2)	2 (4.4)	3 (11.1)	0.360
Cloxacillin resistance	10 (20.4)	7 (15.6)	5 (18.5)	0.870
Mixed first <i>S.aureus</i> isolation	18 (36.7)	14 (31.3)	11 (40.7)	0.693
Consecutive <i>P.aeruginosa</i> isolation	8 (16.3)	16 (35.6)	6 (22.2)	0.092

- 166 ICU: Intensive care unit, CNS: central nervous system, APACHE-II: Acute Physiology and Chronic  
167 Health Evaluation II, CPIS: clinical pulmonary infection score.
- 168 <sup>a</sup> Includes anoxic coma, brain neoplasia, epilepsy, encephalopathy and convulsions.
- 169 \* *p* was considered significant if <0.05.

RESEARCH ARTICLE

# Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections

Meissiner Gomes-Fernandes<sup>1,2</sup> , Maisem Laabei<sup>1,3</sup> , Natalia Pagan<sup>1</sup>, Jessica Hidalgo<sup>1</sup>, Sònia Molinos<sup>1</sup>, Raquel Villar Hernandez<sup>1</sup>, D. Domínguez-Villanueva<sup>1</sup>, A. Toby A. Jenkins<sup>4</sup>, Alicia Lacoma<sup>1,5</sup> , Cristina Prat<sup>1,5</sup> \*

**1** Microbiology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut d' Investigació Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain, **2** CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília, Brazil, **3** Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath, United Kingdom, **4** Department of Chemistry, University of Bath, Bath, United Kingdom, **5** CIBER Enfermedades Respiratorias, CIBER, Instituto de Salud Carlos III, Badalona, Spain

 These authors contributed equally to this work.

<sup>3</sup> These authors also contributed equally to this work and are co-senior authors on this work.

\* [crisprat2010@gmail.com](mailto:crisprat2010@gmail.com)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Gomes-Fernandes M, Laabei M, Pagan N, Hidalgo J, Molinos S, Villar Hernandez R, et al. (2017) Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. PLoS ONE 12(4): e0175552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175552>

**Editor:** Jan Kluytmans, Amphia Ziekenhuis, NETHERLANDS

**Received:** November 25, 2016

**Accepted:** March 28, 2017

**Published:** April 14, 2017

**Copyright:** © 2017 Gomes-Fernandes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work has been funded by the project PI13/01418 which is part of "Plan Nacional de I+D +I" and co-funded by ISCIII- Subdirección General de Evaluación and "Fondo Europeo de Desarrollo Regional" (FEDER). D. Domínguez-Villanueva is funded by "Plan Nacional de I+D +I" and co-funded by ISCIII- Subdirección General de Evaluación and

## Abstract

### Objective

Characterization of *Staphylococcus aureus* clinical isolates derived from lower respiratory tract infections (LRTIs), and correlation between the functionality of the accessory gene regulator (Agr) and genotypic and phenotypic characteristics, clinical variables and clinical outcome.

### Methods

*S aureus* isolates derived from LRTIs and control groups (nasal carriage and bacteraemia) were genotyped using StaphyType DNA microarray. Agr activity was evaluated using the CAMP synergistic haemolysis assay and the Vesicle Lysis Test (VLT). Discordant strains were analysed by quantitative reverse-transcriptase real-time PCR (qRT-PCR).

### Results

Agr was functional in 79.7% and 84.5% of strains according to the CAMP and VLT assays respectively. Higher concordance with RNAIII expression measured by qRT-PCR was observed with the VLT assay (76.2%) compared with the CAMP assay (23.8%). No statistically significant differences were observed in Agr functionality between the study groups, nor the phenotypical/genotypical bacterial characteristics. No association between increased mortality/respiratory complications and Agr function was observed.

### Conclusions

Agr activity was high (82.2%) in isolates from LRTIs suggesting the importance of this global regulator in lower respiratory tract colonisation and infection. However, equally high Agr

"Fondo Europeo de Desarrollo Regional" (FEDER). M. Gomes-Fernandes is funded by CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil (Brasília, Brazil). Maisem Laabei was supported by a joint ERS/SEPAR fellowship (LTRF 2015). This work also received a grant from the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR 054/2011). The funding sources did not have a role in study design, data collection and interpretation of data, or the decision to submit the work for publication.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

activity was observed in isolates derived from nasal carriage and bacteraemia, contradictory to previous observations. Agr functionality measured by the VLT assay was superior to CAMP assay.

## Introduction

*Staphylococcus aureus* is a commensal and an opportunistic pathogen, described as the causative agent in a wide range of human infections [1]. Although bloodstream and skin and soft-tissue infections represent the major burden of staphylococcal disease, lower respiratory tract infections (LRTI) by *S. aureus* have been increasing in the hospital setting [2, 3]. However, bacterial colonisation of the respiratory environment is known [4], making the distinction between asymptomatic colonization and infection difficult [5].

In order to establish and maintain infection, *S. aureus* utilizes an arsenal of virulence factors, which vary depending on its growth phase. The accessory gene regulatory (Agr) system is one of the most important and well-characterised operons in *S. aureus* biology, central in the control and regulation of virulence gene expression [6±9]. The operon is autocatalytic, controlled in a cell density-dependent fashion through the production and sensing of auto-inducing peptides (AIP). The Agr locus consists of two divergent transcripts, RNAII and RNAIII, driven by two promoters, P2 and P3 respectively. Activation of the P2 promoter drives the expression of the components of the quorum-sensing system (AgrBDCA). AgrB and D combine to process and secrete the AIP, which in turn acts as the ligand binding to the AgrC receptor [10]. AgrC and AgrA function as a classical two-component signal transduction system where activated AgrC phosphorylates the DNA-binding response regulator, AgrA, leading to dimerization and binding to the intergenic region between P2 and P3 promoters upregulating their expression [8]. Expression from the P3 promoter drives the synthesis of RNAIII, a highly abundant RNA effector molecule which also contains the 26 amino acid delta ( $\delta$ )-haemolysin [11]. During post exponential growth, RNAIII acts reciprocally, mediating a switch from the expression of surface proteins such as protein A (SpA) to toxins and enzymes such as alpha haemolysin and proteases [11]. Airway colonization by *S. aureus* is a precursor for the development of LRTI, however little is known about the pathogen-associated factors that promote progression from colonization to LRTI [12]. It has been widely documented that a functional Agr is central for causing disease in animal models of infection [13±15]. However, numerous reports suggest that the role of Agr in human infection is more complex, compounded by the isolation of Agr dysfunctional strains from clinical samples [16±21]. Agr dysfunction has been associated with persistent bacteraemia, decreased susceptibility to vancomycin and thrombin-induced platelet microbicidal protein [16, 19]. Agr dysfunctional strains generally have a higher biofilm capacity and are more fit *in vitro* due to the large metabolic burden of having an active Agr system [22, 23].

Both qualitative and quantitative methods can be employed to evaluate Agr activity. The classical method of measuring Agr is via the CAMP assay, which utilises the expression of delta toxin as a surrogate for RNAIII and thus Agr function. This method relies on the synergistic haemolysis of red blood cells by delta toxin in conjunction with beta-toxin [24, 25]. Despite the straightforward handling of this assay, the interpretation of results can be subjective due to low sensitivity [17]. Recently, analytical techniques such as Whole-Cell Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry [26, 27] and high-performance liquid chromatography (HPLC) [28] have been successfully used to

detect delta-toxin and evaluate Agr status. While both of these techniques are highly sensitive, their use for Agr evaluation has not been used frequently possibly due to high purchase costs. Detecting and quantifying Agr at the transcript level using probes (Northern blotting) or primers (quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR)) directed against RNAIII has been used extensively [11, 29, 30]. Although both of these techniques are considerably more sensitive than CAMP, both are time consuming, laborious and expensive. A new method, the Vesicle Lysis Test (VLT), employing phospholipid vesicles containing self-quenched fluorescent dye which are specific to delta and phenol-soluble modulins toxins, acting as surrogates as RNAIII and RNAII activity has been developed [31]. Based on the current literature we decided to include the CAMP assay, as this is the conventional assay performed. In parallel, we chose to use the VLT assay as this was illustrated to be fast, highly sensitive and amenable to high-throughput. Due to the high sensitivity of qRT-PCR we chose to use this assay to evaluate Agr activity in discordant strains.

Based on the complex relationship between Agr and human infection and the lack of understanding of factors associated with *S. aureus* LRTIs, the objectives of this study were two-fold. 1) To evaluate Agr function in clinical *S. aureus* isolates derived from LRTIs and control groups (nasal carriage and bacteraemia); and 2) to investigate correlations between Agr functionality and strain's genotypic and phenotypic characteristics, clinical variables and clinical outcome.

## Materials and methods

### Study groups and bacterial strains

*S. aureus* isolates included in this study were retrospectively selected from a strain collection at the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, a tertiary care hospital in Badalona, Spain. These isolates were obtained from intensive care unit (ICU) and non ICU patients presenting LRTIs as well as from adult nasal carriers and patients presenting bacteraemia, both representing control groups (Table 1). Ethical approval was provided by the Institutional Review Board: Comitè d'Ètica de la Investigació de l'Hospital Germans Trias i Pujol. Study was performed according to confidentiality criteria and dissociation of patients' identification data. Patient informed consent was not needed because clinical samples were not analyzed. Only clinical strains isolated during routine diagnostic tests were used, and were irreversible dissociated in order to guarantee confidentiality. All isolates were obtained from primary cultures and stored at -80°C in maintenance freeze medium (Oxoid TP, 15731) until required to minimise

**Table 1. Distribution of methicillin resistance, Agr functionality<sup>a</sup> and Agr allele according to the study group considered.**

Study group (n)	MRSA (%)	Agr Functionality <sup>a</sup> , n (%)		Allele agr, n (%)			
		Positive	Negative	I	II	III	IV
Pneumonia (22)	4 (18.2)	19 (86.4)	3 (13.6)	10 (45.5)	9 (40.9)	2 (9.1)	1 (4.5)
Tracheobronchitis (35)	8 (22.9)	27 (77.1)	8 (22.9)	15 (42.9)	14 (40.0)	5 (14.3)	1 (2.9)
Bronchial Colonization (29)	7 (24.1)	25 (86.2)	4 (13.8)	11 (37.9)	13 (44.8)	4 (13.8)	1 (3.4)
Other LRTI (9) <sup>b</sup>	3 (33.3)	7 (77.8)	2 (22.2)	5 (55.6)	4 (44.4)	0 (0)	0 (0)
Carriage (35)	2 (5.7)	29 (82.9)	6 (17.1)	13 (37.1)	7 (20.0)	15 (42.9)	0 (0)
Bacteraemia (18)	1 (5.6)	15 (83.3)	3 (16.7)	7 (38.9)	4 (22.2)	7 (38.9)	0 (0)
Total (148)	25 (16.8)	122 (82.4)	26 (17.6)	61 (41.2)	51 (34.5)	33 (22.3)	3 (2.0)

<sup>a</sup> Agr functionality determined through CAMP, VLT and discordant strains resolved by qRT-PCR.

<sup>b</sup> Other LRTI include: Pneumonitis: 1 strain; Bronchoaspiration pneumonia: 3 strains; Tracheostomy infection: 5 strains.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175552.t001>

mutations that may affect Agr activity [17]. Strains were phenotypically characterized by conventional identification (Gram stain, selective culture media, coagulase test) and antibiotic susceptibility testing was routinely performed using the standard disk diffusion method and interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute. Strains were genotypically characterised and Agr activity was evaluated using the classical CAMP synergistic haemolysis test [17], the Vesicle Lysis Test [31] and by using real time quantitative reverse transcriptase -PCR (Real time qRT-PCR).

## Clinical definitions

Patients with LRTIs admitted to the ICU were classified according to Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS) [32], into: bronchial colonization, tracheobronchitis or pneumonia. Other LRTI included isolates from patients presenting bronchial aspiration, tracheostomy infection and pneumonitis. Persistent respiratory isolation/bacteremia was considered as 72 hours positive cultures after patients received adjusted antibiotic treatment. Respiratory complications for patients with LRTIs were defined as respiratory failure, atelectasis, empyema, pleural effusion, pneumothorax, reinfection or shock.

## Agr CAMP assay

The conventional method used to determine the Agr functionality is via  $\delta$ -haemolysin production. Agr functionality was determined by cross-streaking *S. aureus* isolates perpendicularly to RN4220 on sheep blood agar (SBA, Oxoid, UK). RN4220 is a *S. aureus* strain that produces a large zone of  $\beta$ -haemolysin without the interference of  $\alpha$ - or  $\delta$ -haemolysin. Plates were incubated at 37°C overnight followed by a 24 h incubation at 4°C after which they were documented. The presence of synergistic haemolysis within the  $\beta$ -haemolysin zone indicates the production of  $\delta$ -haemolysin and, therefore, a functional Agr locus. In contrast, Agr dysfunction was defined as the complete absence of  $\delta$ -haemolysin within the  $\beta$ -haemolysin zone. In order to establish the final result, three different observers analysed the photographs, and the presence or absence of  $\delta$ -haemolysin was determined by consensus, according to Traber *et al* [17].

## Vesicle lysis test

*S. aureus* isolates were streaked onto tryptic Soy agar (TSA) and single colonies were transferred to 5 mL tryptic soy broth (TSB) and grown in a shaking incubator (180 rpm) for 18 h at 37°C. 1 mL of culture was harvested and centrifuged at 14000  $\times$  g for 10 min, and 500  $\mu$ L of supernatant were recovered, stored at -20°C and lyophilized. These steps were performed in triplicate. The protocol for vesicle formulation has been described previously [31]. For the Vesicle Lysis Test (VLT), the lyophilized supernatants were resuspended with 500  $\mu$ L of molecular grade water and a 50  $\mu$ L aliquot was incubated with 50  $\mu$ L of vesicle solution. Positive and negative controls were pure vesicles with 0.01% Triton X-100 and HEPES, respectively. The fluorescence intensity of each sample was measured for 30 min at excitation and emission wavelengths of 485 $\pm$ 520 nm, respectively, on a FLUORostar fluorimeter (BMG Labtech, UK). Normalized fluorescence was achieved using the equation  $(F_t - F_0)/(F_m - F_0)$ , where  $F_t$  is the average fluorescence value at a specific time point,  $F_0$  is the minimum and  $F_m$  is the maximum fluorescence value in that particular experiment.

## Reverse transcription and quantitative RT-PCR

*S. aureus* isolates grown overnight in TSB were diluted 1:1000 in fresh TSB and grown at 37°C for 6 h. Cultures were normalised based on OD<sub>600</sub> measurements prior to RNA isolation.

Cultures were treated with two volumes of RNAprotect (Qiagen, USA) incubated for 10 min at room temperature, centrifuged at  $3000 \times g$  and the pellet was resuspended in Tris-EDTA (TE) buffer (Ambion, USA) with lysostaphin (Cell sciences, Canada) (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and incubated for 1 h, followed by proteinase K treatment for 30 min. RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions with the addition of turbo DNase (Ambion, USA) following the purification step. RNA was quantified using RNA BR kit (Qubit, ThermoFisher Scientific, UK) and the absence of DNA was verified by PCR. Reverse transcription was performed using the QuantiTect reverse transcription system (Qiagen, USA) according to manufacturer's instructions. Standard curves were generated for both gyrase B [*gyrFW*: 5' -CCAGGTAAATTAGCCGATTGC-3'; *gyrRV*: 5' - AAATCGCCTGCGTTC TAGAG] and RNAIII primers [*rnaIIIFW*: 5' - GAAGGAGTGATTTCAATGGCACAAG-3'; *rnaIIIRV*: 5' GAAAGTAATTAATTATTTCATCTTATTTTTTTAGTGAAATTTG-3'] using genomic DNA to determine primer efficiency. Real-time PCR was performed using the SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA) and the Step-One Real Time PCR detection system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA). Cycling conditions were 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min and a dissociation step 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Quantities derived from standard curves were determined for 2 biological repeats and relative expression normalised to the value of the positive control (RN6390B). We determined a strain to be Agr functional with RNAIII expression levels determined to be a minimum of within 10-fold of the positive control. Isolates that had less than 10-fold level of the positive control after sampling at 6h were classified as Agr dysfunction, based on previous findings determining delayed RNAIII expression and Agr dysfunction [17, 33].

Agr functionality was categorized into positive/ negative by CAMP, VLT and/ or qRT-PCR.

## Genotypic characterization

*S. aureus* isolates were genotypically characterised using the StaphyType DNA microarray (Alere Technologies, Jena, Germany) [34, 35]. The Microtiter strip-mounted DNA microarrays used covered 334 target sequences (approximately 170 distinct genes and their allelic variants). PCR amplification and hybridization were performed following manufacturer's instructions. An image of the array was recorded and analysed using a designated reader and software (Arraymate, Iconoclust, Alere Technologies) [36].

## Statistical analysis

Pearson's chi-square or Fisher test was applied when comparing categorical clinical and microbiological variables. Kappa (k) values below 0.40 indicate weak correlation, values of  $0.41 \pm 0.60$  indicate good agreement and values above 0.60 indicate strong agreement. Univariate and multivariate analysis as well as a logistic regression model were performed.

Associations were considered statistically significant if p value was  $<0.05$ . Data was analysed with SPSS v15 (SPSS Inc, Chicago, IL).

## Results

### Bacterial strains and study group

A total of 148 strains corresponding to 142 patients were included: 95 strains isolated from respiratory specimens (89 tracheal aspirates, 4 sputa, 1 pleural fluid and 1 protected specimen brush) from 93 patients with clinical suspicion of LRTI, 35 strains from nasal swab samples, corresponding to nasal carriers and 18 strains isolated from blood cultures.

Of the total of 148 strains included in this study, 25 (16.9%) were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and 123 (83.1%) were methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) (Table 1), with 11 (8.9%) of the 142 patients designated as previous MRSA carriers. From the 111 patients presenting infection (either LRTI or bacteraemia), the origin was nosocomial (84.7%), community acquired (12.6%), and health care associated (2.7%).

High clonal complex (CC) diversity was observed among isolates included in the study. For MSSA isolates, the most frequent CCs were CC30 (22%), CC5 (17.9%) and CC45 (17.1%), whereas for MRSA isolates, CC5 (72%) was the most frequent, followed by CC22 (16%). Previous studies have highlighted that CC5 is the most frequent MRSA clonal type in Spain [37].

### Measuring Agr activity: CAMP versus VLT

The 148 isolates representing the three study groups [LTRI (n = 95), nasal carriage (n = 35) and bacteraemia (n = 18)] were assayed using both the classical CAMP assay and VLT (S1 Table), where Agr functionality was observed in 118 and 125 strains (79.7% and 84.5%) respectively. Table 1 shows the percentages of MRSA, Agr functionality and distribution of Agr alleles, in the different study groups. Concordance between both phenotypic Agr tests was 85.8% (127/148) ( $\kappa$ : 0.519; SE: 0.091) (Table 2). Each sample group was analysed separately: in the LTRIs group, Agr activity was functional in 77 (81.1%) and 79 (83.2%) strains using the Agr CAMP assay and VLT, respectively. Concordance between both tests was 85.2% (81/95) ( $\kappa$ : 0.499; SE: 0.116). Results from the nasal carriage group showed that Agr was functional in 28 (80%) and 29 (82.9%) strains using the Agr CAMP assay and VLT, respectively. Concordance between both tests was 91.4% (32/35) ( $\kappa$ : 0.717; SE: 0.153). Results from the bacteraemia group highlighted that Agr was functional in 13 and 17 strains (72.2% and 94.4%), respectively. Concordance between both tests was 77.7% (14/18) ( $\kappa$ : 0.265; SE: 0.220).

### Discordant cases VLT vs. CAMP assay

As shown in Table 2, a total of 21 strains presented a discordant result between both tests; LTRIs n = 14, nasal carriage n = 3, bacteraemia n = 4. Of the 21 strains with discordant results, 7 strains exhibited synergy between delta-, alpha- and beta- haemolysins on blood agar plates, and were considered as positive by the CAMP assay according to Traber *et al* [17]. However, for these strains low fluorescence intensity comparable to the negative control was observed, therefore, they were classified as negative by the VLT test. In the remaining 14 strains, the pattern of haemolysis on the SBA corresponded to an exclusive presence of beta haemolysis for 6 strains, and lack of haemolysis for 8 strains, therefore they were considered as negative by the CAMP assay. However, for these strains an increased fluorescence was measured, therefore they were classified as positive by the VLT test. To accurately determine the Agr functionality in the discordant cases, we measured the level of expression of RNAPIII by real time quantitative reverse transcriptase -PCR (Real time qRT-PCR) (Table 3, S1 Fig). Of the 21 discordant strains, according to CAMP assay and RNAPIII expression, a functional Agr was observed in 7 (33.3%) and 11 (52.4%) strains, respectively. Concordance between both tests was 23.8%

**Table 2. Concordance between VLT test and CAMP assay results.**

CAMP Assay result	VLT result		Total (%)
	Positive (%)	Negative (%)	
Positive (%)	111 (94.1)	7 (5.9)	118 (79.7)
Negative (%)	14 (46.7)	16 (53.3)	30 (20.3)
<b>Total (%)</b>	<b>125 (84.4)</b>	<b>23 (15.6)</b>	<b>148 (100)</b>

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175552.t002>

**Table 3. Description of discordant cases between VLT and Agr CAMP, including haemolysin pattern, RNA III, Agr allele and clonal complex.**

Study group (n) Isolate ID	VLT result	Agr CAMP result	Agr CAMP assay (haemolysin)	RNAIII expression	Agr allele	Clonal Complex
Pneumonia (2)						
S19	Negative	Positive	Alpha and delta	Negative	II	CC5/ST5-MRSA-I
S116	Negative	Positive	Alpha and delta	Negative	II	CC1(ST573/772-MSSA)
Tracheobronchitis (8)						
S1	Negative	Positive	Alpha and delta	Negative	I	CC8-MRSA-IV [sea+], Lyon Clone/
S12	Negative	Positive	Alpha and delta	Negative	I	UK-EMRSA-2
S28	Positive	Negative	Beta	Positive	I	CC22-MSSA
S44	Positive	Negative	Beta	Positive	III	CC45-MSSA
S50	Negative	Positive	Alpha and delta	Negative	I	CC30-MSSA
S55	Positive	Negative	No hemolysin	Negative	III	CC398-MSSA [PVL+]
S124	Positive	Negative	No hemolysin	Positive	II	CC30-MSSA
S132	Positive	Negative	Beta	Positive	II	CC5-MRSA-IV, Paediatric clone CC15-MSSA
Bronchial Colonization (3)						
S71	Positive	Negative	Beta	Positive	II	CC5-MSSA
S145	Negative	Positive	Alpha and delta	Negative	II	CC5-MSSA
S186	Positive	Negative	No hemolysin	Positive	III	CC30-MSSA
Others LRTI (1)						
S135	Positive	Negative	No hemolysin	Positive	II	CC5-MRSA-IV&VI
Carriage (3)						
S38	Positive	Negative	No hemolysin	Positive	III	CC30-MSSA
S39	Positive	Negative	No hemolysin	Negative	III	CC30-MSSA
S140	Negative	Positive	Alpha and delta	Positive	II	CC5-MSSA
Bacteraemia (4)						
S4077	Positive	Negative	No hemolysin	Positive	II	CC15-MSSA
S4124	Positive	Negative	No hemolysin	Negative	II	CC5-MSSA
S4171	Positive	Negative	Beta	Negative	III	CC30-MSSA
S4172	Positive	Negative	Beta	Positive	I	CC8-MSSA-SCCfus

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175552.t003>

(5/21) ( $\kappa$ : -0.5; SE: 0.183). According to VLT and RNAIII expression, a functional Agr was observed in 14 (66.7%) and 11 (52.4%) strains respectively, with a concordance between both tests of 76.2% (16/21) ( $\kappa$ : 0.516; SE: 0.18).

### Correlation between Agr functionality and phenotypical and genotypical variables

Agr activity, determined through CAMP, VLT and qRT-PCR, was positive in 122 (82.4%) of the isolates (n = 148) examined. 72% of MRSA and 84.5% of MSSA isolates were Agr positive. Agr function and study groups were analysed separately. Among the 95 strains from respiratory samples, Agr was functional in 78 cases (82.1%). 22 (23.2%) out of the 95 strains were MRSA whereas 73 (76.8%) were MSSA. Regarding the 35 strains from nasal carriers, Agr was functional in 29 (82.9%) cases. 2 (5.7%) out of the 35 strains were MRSA and 33 (94.3%) were MSSA. Among the 18 strains isolated from patients with bacteraemia, Agr was functional in 15 (83.3%). One (5.6%) strain of this group was MRSA whereas 17 (94.4%) were MSSA.

We investigated potential associations between Agr functionality and the Agr allele. The most frequent group Agr allele group in the LRTIs group was AgrI (43.2%), followed by AgrII (42.1%), AgrIII (11.6%), and AgrIV (3.2%). For the strains isolated from nasal carriers, the AgrIII (42.9%) was the most frequent, followed by AgrI (37.1%) and AgrII (20%). Agr group distribution of the strains isolated from bacteraemia were both Agr I and Agr III (38.9%) and

**Table 4. Correlation between Agr functionality determined through CAMP, VLT and qRT-PCR and genotypic characteristics, defined as presence (Pos) or absence (Neg) of specific virulence factor gene probes.**

Array gene probes		LRTI (n = 95)			Carriage (n = 35)			Bacteraemia (n = 18)		
		Agr functionality		p-value	Agr functionality		p-value	Agr functionality		p-value
		Positive, n (%)	Negative, n (%)		Positive, n (%)	Negative, n (%)		Positive, n (%)	Negative, n (%)	
mecA	Pos	16 (76.2)	5(23.8)	0.519	0 (0)	2 (33.3)	0.025*	1 (6.7)	0 (0)	1
	Neg	62 (83.8)	12 (16.2)		29 (87.9)	4 (12.1)		14 (82.4)	3 (17.6)	
sarA	Pos	77 (81.9)	17 (18.1)	1	29 (82.9)	6 (17.1)	N/A	15 (83.3)	3 (16.7)	N/A
	Neg	1 (100)	0 (0)		-	-		0 (0)	0 (0)	
sak <sup>a</sup>	Pos	58 (81.7)	13 (18.3)	0.084	24 (82.8)	5 (17.2)	1	13 (81.3)	3 (18.8)	1
	Neg	20 (87)	3 (13)		5 (83.3)	1 (16.7)		2 (100)	0 (0)	
lukS/F-PVL	Pos	0 (0)	1 (100)	0.169	-	-	N/A	1 (100)	0 (0)	1
	Neg	78 (83)	16 (17)		29 (82.9)	6 (17.1)		14 (82.4)	3 (17.6)	
chp <sup>a</sup>	Pos	59 (84.3)	11 (15.7)	0.530	22 (81.5)	5 (18.5)	1	12 (80)	3 (20)	0.558
	Neg	18 (75)	6 (25)		7 (87.5)	1 (12.5)		3 (100)	0 (0)	
scn	Pos	71 (83.5)	14 (16.5)	0.253	26 (83.9)	5 (16.1)	0.546	14 (82.4)	3 (17.6)	0.833
	Neg	7 (70)	3 (30)		3 (75)	1 (25)		1 (100)	0 (0)	
tst1 <sup>b</sup>	Pos	13 (76.5)	4 (23.5)	0.497	12 (80)	3 (20)	0.853	4 (80)	1 (20)	0.650
	Neg	65 (83.3)	13 (16.7)		16 (84.2)	3 (15.8)		11(84.6)	2 (15.4)	
Agr allele	I	33 (80.5)	8 (19.5)	0.254	12(41.4)	1 (16.7)	0.461	6 (85.7)	1 (14.3)	0.879
	II	35 (87.5))	5 (12.5)		5 (17.2)	2 (33.3)		3 (75)	1 (25)	
	III	7 (63.6)	4 (36.4)		12 (41.4)	3 (50)		6 (85.7)	1 (14.3)	
	IV	3 (100)	0 (0)		-	-		0 (0)	0 (0)	

LRTI: lower respiratory tract infection, including pneumonia, tracheobronchitis, bronchial colonization, pneumonitis, bronchoaspiration pneumonia and tracheostomy infection.

agr: accessory gene regulator, sarA: staphylococcal accessory regulator A, mecA: penicillin binding protein 2A, lukS/F-PVL: Pantone Valentine leukocidin, chp: chemotaxis inhibiting protein, scn: staphylococcal complement inhibitor, tst1: toxic shock syndrome toxin 1, N/A: not applicable

All comparisons were done for each study group.

<sup>a</sup>For one strain from LRTI group an ambiguous result was obtained for the corresponding probes in the StaphyType DNA microarray.

<sup>b</sup>For one strain from carriers group an ambiguous result was obtained for the corresponding probe in the StaphyType DNA microarray.

\* p < 0.05

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175552.t004>

AgrII (22.2%) (Table 1). No statistically significant association was found between Agr functionality and Agr allele (Table 4).

When analysing together strains from the three study groups no statistical significant correlations were observed between the Agr function and methicillin resistance, clonal complex, the Agr allele, or the presence of genes encoding virulence factors. When groups analysed separately a significant association between Agr function and sensitivity to cloxacillin was observed in the nasal carriers (p = 0.025). However, this is most likely biased by the low sample number in this group (Table 4).

### Correlation between Agr functionality and clinical variables

Of the 93 patients presenting LRTI, 10 (10.8%) of them were previous MRSA carriers. Persistent isolation despite adjusted antibiotic treatment was observed in 41 (45.1%) patients. Presence of respiratory complication was documented in 18 cases (19.6%). Among the 18 patients, 5 (5.4%) fatal cases were related to respiratory infection. No statistically significant correlations were observed neither between Agr functionality and persistent isolation nor between Agr

**Table 5. Correlation between Agr functionality and clinical variables.**

Clinical variables		LRTI (n = 93) <sup>a</sup>			Bacteraemia (n = 18)		
		Agr functionality		p-value	Agr functionality		p-value
		Positive, n (%)	Negative, n (%)		Positive, n (%)	Negative, n (%)	
Persistent isolation after 72h <sup>b</sup>	No	41 (82)	9 (18)	1	13 (86.7)	2 (13.3)	0.442
	Yes	34 (82.9)	7 (17.1)		2 (66.7)	1 (33.3)	
Development of complications/mortality	No	59 (79.7)	15 (20.3)	0.509	8 (80)	2 (20)	1
	Yes	16 (88.9)	2 (11.1)		7 (87.5)	1 (12.5)	

<sup>a</sup>For the 93 patients in the LRTI group, persistent isolation after 72h was not considered for two cases, as these patients did not receive antibiotic treatment.

<sup>b</sup>Persistent isolation after 72h despite adjusted antimicrobial treatment

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175552.t005>

functionality and presence of respiratory complications and death. Among the 18 patients presenting bacteraemia, in 3 (16.7%) cases, positive blood culture was obtained after 72 hours. Eight (44.4%) cases developed complications: 4 patients (22.2%) presented septic metastasis and 4 patients (22.2%) presented shock. No statistically significant correlations were observed between Agr functionality and persistent blood culture after 72h, and the development of complication and/or death as shown in Table 5. No statistically significant associations were observed when a multivariate analysis was adopted to investigate the relationship between Agr function and clinical or microbiological variables.

## Discussion

The objective of this study was to evaluate the activity of Agr in *S. aureus* clinical isolates derived from lower respiratory tract, and to investigate correlations between the Agr functionality and the clinical and microbiological variables according to the different study groups. Our results illustrate a high percentage (82.1%) of LRTI isolates were Agr functional. This is in agreement with Chaffin *et al*, who observed *hld* and *psm* gene upregulation in a mouse model of pneumonia [38]. Furthermore, virulence genes regulated by Agr have an important function in escape from alveolar macrophages [39, 40] and neutrophils [41], both cells comprising the first line of defence in lung infections. Other groups have highlighted that Agr dysfunction is associated with persistent bacteraemia and that during growth in blood, apolipoproteins can interfere and inhibit quorum sensing and Agr activity [42]. Additionally, downregulating toxicity has been observed to positively influence fitness of *S. aureus* when grown in media supplemented with human serum [43] presumably as a trade-off to offset energetically costly toxin production in the face of a challenging environment. Recently, Painter *et al* reviewed numerous studies and concluded that strains isolated from bacteraemia displayed Agr dysfunction in 3±82% of cases [21]. This large variation may be due to differences in Agr functionality testing, isolate lineage and patient control groups. Agr dysfunction was not associated with bacteraemia strains in our study, where dysfunction was observed in 16.7% of cases.

Previous studies have questioned the sensitivity of the CAMP assay at determining Agr function [31]. Additionally, the interpretation of synergistic haemolysis can be subjective and results may vary between different laboratories, especially for clinical isolates with weak haemolytic activity [17]. To accommodate for these observations, Agr functionality was examined using both the CAMP assay and the VLT, a highly sensitive assay specific to toxins strictly regulated by Agr [31], with discordant strains measured by gold-standard qRT-PCR. Our results report a higher concordance between qRT-PCR and VLT than for CAMP assay.

There are some fundamental differences between these methods that need to be considered when evaluating Agr functionality. VLT has been shown to be highly sensitive to µM

concentrations of specific Agr-regulated delta and PSM $\alpha$ 1 $\pm$ 4 toxins [31], a level of sensitivity which may not be achieved using CAMP assay, resulting in more isolates reported as Agr functional. The VLT is performed using harvested culture supernatant following aerobic growth in liquid broth, whereas the CAMP assay is performed under static conditions using solid agar. The difference in culture conditions may influence Agr functionality as differences in aerobic culture conditions are known to induce differential virulence gene expression [44, 45]. Additionally, the diffusion of toxins through blood agar may be less efficient at lysing cells than the interaction of toxins with vesicular lipid membranes, possibly influencing Agr functionality measurements.

To evaluate Agr function in discordant strains we investigated the expression of RNAIII, a surrogate marker of Agr function by qRT-PCR. RNA was extracted and prepared during late exponential to early stationary phase of growth (6h) where RNAIII expression is maximal [6]. Previous studies have highlighted that late transcription of RNAIII is associated with failure to translate  $\delta$ - and  $\alpha$ - haemolysin resulting in Agr dysfunction [17, 29]. Therefore, this may explain those strains that are designated Agr dysfunctional by CAMP assay but Agr functional by RNAIII measurements, as CAMP assay is dependent on synergistic haemolysis driven by toxin expression. Four strains were designated Agr functional by VLT but dysfunctional by RNAIII measurement. Recent work has shown RNAIII-independent expression of PSM toxins via AgrA binding directly to *psm* promoter [46, 47]. This may explain the above results however further work is required to fully validate this claim.

Given the importance of Agr in virulence factors expression, we investigated whether Agr function was associated with persistent respiratory isolation or complications and persistent bacteraemia. No statistical significant associations were observed in either scenario, however other factors other than Agr function may be important in persistence. *S. aureus* small colony variants (SCV) represent a slow growing sub-population associated with chronic, persistent and relapsing infections [48]. SCVs are phenotypically distinct, displaying reduced pigmentation, haemolysis and increased invasiveness and persistence intracellularly [48]. Recent work has observed that SCV have a rapid reversion rate when grown under laboratory culture conditions and switch to wild type phenotype upon primary culture from clinical samples [49] which may contribute to the lack of microbial factors observed in this study associated with isolates derived from persistent infections.

The importance of correctly confirming Agr functionality of a clinical isolate is highlighted by the importance of Agr for virulence in numerous animal models and associations with clinical observations. This work shows that for the majority of strains a high concordance was observed between CAMP and VLT; however, caution must be used to determine strains that are truly Agr functional/dysfunctional. Although the CAMP assay is the most routinely used to determine Agr functionality, there are pitfalls in terms of accurate measurement, ambiguous results and the impact of delayed RNAIII transcription. Higher concordance was observed between VLT and RNAIII measurements, however the high sensitivity of the VLT assay may wrongly identify Agr dysfunctional strains as functional. Therefore, we propose that a combination of phenotypic and genotypic assays must be used to accurately determine the functionality of Agr and should be used in future experiments designated to investigate associations between clinical outcome or antibiotic susceptibility and Agr function. Using a combination approach would also help to define those isolates that are completely Agr inactive (VLT negative) and those that may have low or delayed Agr activity (CAMP and RNAIII negative). The results exhibited in this study include for the first time, the analysis of Agr function in strains isolated from samples from patients with respiratory infections. However, further studies are required to determine whether the functionality of

the Agr system can be a marker of pathogenicity for strains isolated from respiratory tract infection and whether this has an influence on the clinical outcome.

It is worth to mention that our cohort does not include severe necrotizing pneumonia cases, uncommon in our geographical region. On the other hand, persistence in the respiratory tract is not associated to unfavourable outcome as it is in bacteremia, but more to an adaptation to the niche [50]. Multicentric studies are already taking place in the context of the New Drugs for Bad Bugs programme, an Innovative Medicines Initiative including multiple variables (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02413242>) and will help to elucidate the real importance of bacterial molecular determinants in LRTI.

## Supporting information

**S1 Table. Average fluorescence values obtained by the VLT according to the study group considered.** Fluorescence values obtained by the VLT for the 148 strains analysed. (PDF)

**S1 Fig. Measurement of RNAPIII transcription by quantitative reverse transcribed RT-PCR.** RNAPIII transcripts of the 21 discordant strains were evaluated following RNA extraction at 6h. Fold change in RNAPIII expression has been normalised to the positive control (RN6390B\*) with negative control strain (RN6911) illustrated for comparison purposes. Red line denotes the cut-off used to discriminate between Agr functional and dysfunctional strains. (PDF)

## Author Contributions

**Conceptualization:** CP AL.

**Data curation:** MGF ML AL.

**Formal analysis:** MGF ML AL.

**Funding acquisition:** CP AL.

**Investigation:** MGF ML AL.

**Methodology:** ATAJ ML MGF JH NP DDV RVH.

**Project administration:** CP AL.

**Resources:** SM ATAJ.

**Supervision:** CP AL.

**Validation:** MGF ML CP AL.

**Visualization:** MGF ML.

**Writing ± original draft:** MGF ML.

**Writing ± review & editing:** ML CP AL.

## References

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. The New England journal of medicine. 1998; 339(8):520±32. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806> PMID: 9709046
2. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus species*: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY

- Antimicrobial Surveillance Program, 1997±1999. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2001; 32 Suppl 2:S114±32.
3. Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010; 51 Suppl 1:S81±7.
  4. Parker D, Prince A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. Seminars in immunopathology. 2012; 34(2):281±97. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0291-7> PMID: 22037948
  5. Lacoma A, Gomes-Fernandes M, Mesalles E, Arméstar F, Villar R, Casas I, et al. Persistence of *Staphylococcus aureus* in lower respiratory tract in patients undergoing mechanical ventilation. The European respiratory journal. 2015;Suppl 59:PA2640.
  6. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Molecular microbiology. 2003; 48(6):1429±49. PMID: 12791129
  7. Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. The Journal of clinical investigation. 2003; 112(11):1620±5. <https://doi.org/10.1172/JCI20442> PMID: 14660735
  8. Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. Annual review of genetics. 2008; 42:541±64. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091640> PMID: 18713030
  9. Bronner S, Monteil H, Prevost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. FEMS microbiology reviews. 2004; 28(2):183±200. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.003> PMID: 15109784
  10. Wang L, Quan C, Xiong W, Qu X, Fan S, Hu W. New insight into transmembrane topology of *Staphylococcus aureus* histidine kinase AgrC. Biochimica et biophysica acta. 2014; 1838(3):988±93. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.12.006> PMID: 24361366
  11. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. The EMBO journal. 1993; 12(10):3967±75. PMID: 7691599
  12. Stulik L, Malafa S, Hudcova J, Rouha H, Henics BZ, Craven DE, et al. alpha-Hemolysin activity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* predicts ventilator-associated pneumonia. American journal of respiratory and critical care medicine. 2014; 190(10):1139±48. <https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1012OC> PMID: 25303310
  13. Abdelnour A, Arvidson S, Bremell T, Ryden C, Tarkowski A. The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. Infection and immunity. 1993; 61(9):3879±85. PMID: 8359909
  14. Bunce C, Wheeler L, Reed G, Musser J, Barg N. Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. Infection and immunity. 1992; 60(7):2636±40. PMID: 1612733
  15. Cheung AL, Eberhardt KJ, Chung E, Yeaman MR, Sullam PM, Ramos M, et al. Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. The Journal of clinical investigation. 1994; 94(5):1815±22. <https://doi.org/10.1172/JCI117530> PMID: 7962526
  16. Fowler VG Jr., Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, Cabell CH, et al. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. The Journal of infectious diseases. 2004; 190(6):1140±9. <https://doi.org/10.1086/423145> PMID: 15319865
  17. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Microbiology. 2008; 154(Pt 8):2265±74. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011874-0> PMID: 18667559
  18. Smyth DS, Kafer JM, Wasserman GA, Velickovic L, Mathema B, Holzman RS, et al. Nasal carriage as a source of agr-defective *Staphylococcus aureus* bacteremia. The Journal of infectious diseases. 2012; 206(8):1168±77. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis483> PMID: 22859823
  19. Schweizer ML, Furuno JP, Sakoulas G, Johnson JK, Harris AD, Shardell MD, et al. Increased mortality with accessory gene regulator (agr) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011; 55(3):1082±7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00918-10> PMID: 21173172
  20. Chong YP, Kim ES, Park SJ, Park KH, Kim T, Kim MN, et al. Accessory gene regulator (agr) dysfunction in *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from South Korean patients. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013; 57(3):1509±12. <https://doi.org/10.1128/AAC.01260-12> PMID: 23254438
  21. Painter KL, Krishna A, Wigneshweraraj S, Edwards AM. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? Trends in microbiology. 2014; 22(12):676±85. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.002> PMID: 25300477

22. Sakoulas G, Moise PA, Rybak MJ. Accessory gene regulator dysfunction: an advantage for *Staphylococcus aureus* in health-care settings? *The Journal of infectious diseases*. 2009; 199(10):1558±9. <https://doi.org/10.1086/598607> PMID: 19392634
23. Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, DeLeo FR, Cole RL, Hoff JS, et al. In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. *Journal of bacteriology*. 2002; 184(5):1430±7. <https://doi.org/10.1128/JB.184.5.1430-1437.2002> PMID: 11844774
24. Elek SD, Levy E. Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1950; 62(4):541±54. PMID: 14804233
25. Janzon L, Lofdahl S, Arvidson S. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular & general genetics: MGG*. 1989; 219(3):480±5.
26. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydiere AM, Ader F, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *PloS one*. 2012; 7(7): e40660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040660> PMID: 22792394
27. Valour F, Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Gagnaire J, Bouaziz A, Karsenty J, et al. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015; 21(6):568 e1± 11.
28. Otto M, Gotz F. Analysis of quorum sensing activity in staphylococci by RP-HPLC of staphylococcal delta-toxin. *BioTechniques*. 2000; 28(6):1088, 90, 92, 96. PMID: 10868273
29. Seidl K, Chen L, Bayer AS, Hady WA, Kreiswirth BN, Xiong YQ. Relationship of agr expression and function with virulence and vancomycin treatment outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011; 55(12):5631±9. <https://doi.org/10.1128/AAC.05251-11> PMID: 21968365
30. Viedma E, Sanz F, Orellana MA, San Juan R, Aguado JM, Otero JR, et al. Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014; 69(1):51±8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt337> PMID: 23975741
31. Laabei M, Jamieson WD, Massey RC, Jenkins AT. *Staphylococcus aureus* interaction with phospholipid vesicles—a new method to accurately determine accessory gene regulator (agr) activity. *PloS one*. 2014; 9(1):e87270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087270> PMID: 24498061
32. Zilberberg MD, Shorr AF. Ventilator-associated pneumonia: the clinical pulmonary infection score as a surrogate for diagnostics and outcome. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010; 51 Suppl 1:S131±5.
33. Traber K, Novick R. A slipped-mispairing mutation in AgrA of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of agr and failure to translate delta- and alpha-haemolysins. *Molecular microbiology*. 2006; 59(5):1519±30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.04986.x> PMID: 16468992
34. Monecke S, Jatzwauk L, Weber S, Slickers P, Ehricht R. DNA microarray-based genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Eastern Saxony. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008; 14(6):534±45.
35. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PloS one*. 2011; 6(4): e17936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017936> PMID: 21494333
36. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008; 53(2):237±51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00426.x> PMID: 18507678
37. Argudin MA, Mendoza MC, Mendez FJ, Martin MC, Guerra B, Rodicio MR. Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 47(7):2097±105. <https://doi.org/10.1128/JCM.01486-08> PMID: 19458176
38. Chaffin DO, Taylor D, Skerrett SJ, Rubens CE. Changes in the *Staphylococcus aureus* transcriptome during early adaptation to the lung. *PloS one*. 2012; 7(8):e41329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041329> PMID: 22876285
39. Giese B, Glowinski F, Paprotka K, Dittmann S, Steiner T, Sinha B, et al. Expression of delta-toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial

- cells in the presence of beta-toxin. Cellular microbiology. 2011; 13(2):316±29. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01538.x> PMID: 20946243
40. Munzenmayer L, Geiger T, Daiber E, Schulte B, Autenrieth SE, Fraunholz M, et al. Influence of Sae and Agr regulated factors on the escape of *Staphylococcus aureus* from human macrophages. Cellular microbiology. 2016; 18(8):1172±83. <https://doi.org/10.1111/cmi.12577> PMID: 26895738
  41. Surewaard BG, van Strijp JA, Nijland R. Studying interactions of *Staphylococcus aureus* with neutrophils by flow cytometry and time lapse microscopy. Journal of visualized experiments: JoVE. 2013;(77): e50788. <https://doi.org/10.3791/50788> PMID: 23893048
  42. Malachowa N, Whitney AR, Kobayashi SD, Sturdevant DE, Kennedy AD, Braughton KR, et al. Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood. PLoS one. 2011; 6(4):e18617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018617> PMID: 21525981
  43. Laabei M, Uhlemann AC, Lowy FD, Austin ED, Yokoyama M, Ouadi K, et al. Evolutionary Trade-Offs Underlie the Multi-faceted Virulence of *Staphylococcus aureus*. PLoS biology. 2015; 13(9):e1002229. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002229> PMID: 26331877
  44. Ross RA, Onderdonk AB. Production of toxic shock syndrome toxin 1 by *Staphylococcus aureus* requires both oxygen and carbon dioxide. Infection and immunity. 2000; 68(9):5205±9. PMID: 10948145
  45. Cramton SE, Ulrich M, Gotz F, Doring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infection and immunity. 2001; 69(6):4079±85. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.4079-4085.2001> PMID: 11349079
  46. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TH, Khan BA, Sturdevant DE, et al. RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. Molecular cell. 2008; 32(1):150±8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.005> PMID: 18851841
  47. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. Nature reviews Microbiology. 2013; 11(10):667±73. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3110> PMID: 24018382
  48. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nature reviews Microbiology. 2006; 4(4):295±305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1384> PMID: 16541137
  49. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Volker W, Heitmann V, Niemann S, et al. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. EMBO molecular medicine. 2011; 3(3):129±41. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000115> PMID: 21268281
  50. Prat C, Lacombe A. Bacteria in the respiratory tract-how to treat? Or do not treat? International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2016; 51:113±22.