

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CON ESPECIALIZACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA

Caracterización Molecular de Aislados de Staphylococcus aureus
Resistente a meticilina (SARM) utilizando mecA-PCR Y PCR-RFLP.

PRESENTADA POR
MARILENA CALDERÓN GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. NORA ORTÍZ DE MORENO
ASESOR: DR. CARLOS RAMOS.

FECHA:

UNIVERSIDAD DE PANAMA
Vicerrectoría DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

HOJA DE APROBACIÓN

Caracterización Molecular de Aislados de Staphylococcus aureus Resistente a
meticilina (SARM) Utilizando mecA-PCR Y PCR-RFLP.

DIRECTORA

DRA. NORA ORTÍZ DE MORENO.....

Departamento de Microbiología

Universidad de Panamá

Asesor: Dr. Carlos Ramos.

Tesis presentada para optar por el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas
con especialización en Microbiología.

Por la Licenciada Marilena Calderón González.

Panamá, Diciembre, 2017.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis primero a Dios porque ha estado conmigo en los momentos más difíciles, a mis Padres que en paz descansen, a mis hermanos, mi hija y al compañero de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A la Doctora Nora Ortiz de Moreno por confiar en mí. Sin su estímulo, valiosos consejos y ayuda para superar las dificultades, no hubiera conseguido culminar con esta tesis. Me considero una persona afortunada por haber contado con su asesoría.

Al Doctor Carlos Ramos por mantener en mí la ilusión por la investigación, aportando consejos, ánimos y facilitándome la realización de la tesis en su facultad.

A la Doctora Soler quien nos proporcionó los termo-cicladores y su laboratorio para hacer las amplificaciones.

Al personal del Instituto Conmemorativo Gorgas y de Estudios de la Salud Laboratorio Central de referencia en salud pública (ICGES-LCRS) por suministrarnos las cepas de su biblioteca y sus datos epidemiológicos.

A mis jefes José Mejía, Licda. Regina de Alfaro por siempre confiar en mí y darme ánimos cuando más lo necesitaba.

A mis compañeros de maestría pues haciendo trabajo en equipo logramos superar las adversidades.

A mi hija Angie Nicolle Pandiella Calderón y a compañero en los caminos de la vida Daniel Cedeño Bravo por facilitarme el tiempo para dedicarme a los estudios y la investigación.

Tabla de contenido

RESUMEN	xiv
INTRODUCCION	xvi
CAPITULO I: GENERALIDADES DE LA INVESTIGACION	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y SU ESTADO ACTUAL	2
1.2 OBJETIVO GENERAL	3
1.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
1.4 JUSTIFICACION.....	4
CAPITULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	5
2.1 GENERALIDADES DEL <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2 ESTRUCTURA	9
2.3 ENZIMAS Y TOXINAS.....	11
2.4 EPIDEMIOLOGÍA	12
2.6 CUADROS CLINICOS.....	14
2.7 CARACTERISTICAS GENETICAS	17
2.8 RESISTENCIA ANTIBIOTICA	18
2.9 EMERGENCIA Y EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.10 MECANISMO DE RESISTENCIA EN <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.11 GEN <i>mecA</i> y <i>SSC mec</i>	23
2.12 HISTORIA DE LA RESISTENCIA <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.13 EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR SARM EN HOSPITALES	27
2.14 EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR SARM EN LA COMUNIDAD.....	27
2.15 CONTROL DE INFECCIONES POR SARM.....	29
2.16 TRATAMIENTO	29
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 MUESTRAS	32

3.2 TIPO DE ESTUDIO.....	32
3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	32
3.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	32
3.4.1 VALIDACION DE LOS AISLADOS	32
3.4.2 CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	33
3.4.3 EXTRACCIÓN DEL ADN.....	33
3.4.4 AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>mecA</i>	34
3.4.5 AMPLIFICACIONES DE LOS GENES <i>coa</i> Y <i>spa</i>	34
3.4.6 AMPLIFICACIÓN DE GEN <i>HVR</i> (REGIÓN HIPERVARIBLE)	35
3.4.7 DIGESTIÓN DE LOS AMPLICONES.....	36
CAPITULO IV:RESULTADOS.....	38
4.1 RESULTADOS	39
4.1.1 DETECCIÓN DE <i>mecA</i>	39
4.1.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>coa</i>	40
4.1.3 AMPLIFICACION GEN <i>spa</i>	41
4.1.4 AMPLIFICACION GEN <i>HVR</i>	41
4.1.5 RFLP DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE <i>coa</i> , <i>spa</i> y <i>HVR</i>	43
4.2 DISCUSIÓN.	49
4.3 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
4.4 BIBLIOGRAFIA	56
4.5 ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1	Secuencias de los iniciadores utilizados.-----
--	
Cuadro N° 2	Preparación de los iniciadores. -----
-	
Cuadro N° 3	Preparación de la reacción para la amplificación del gen <i>mec A1/mecA2</i> . -----
Cuadro N° 4	Preparación de la reacción para la amplificación del gen <i>mA1/mA2</i> .-----
Cuadro N° 5	Resultados extracción <i>mec A1/mecA2</i> .-----
-	
Cuadro N° 6	Resultados de la extracción <i>mA1/mA2</i> .-----

Cuadro N° 7	Preparación del master mix para la amplificación del gen de la Staphylocoagulasa (<i>coa</i>) en 20 muestras de ADN de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (MRSA) y en una muestra de ADN de <i>Escherichia coli</i> como control negativo de PCR.-----

Cuadro N° 8	Preparación del master mix con 1.0 mM de cloruro de magnesio (MgCl ₂) para optimizar la amplificación de la región hiper variable (<i>HVR</i>) asociada a <i>mec A</i> en seis muestras de ADN de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (MRSA).-----

Cuadro N° 9	Preparación del master mix con 1.3 mM de cloruro de magnesio (MgCl ₂) para optimizar la amplificación de la región hiper variable (<i>HVR</i>) asociada a <i>mecA</i> en seis muestras de ADN de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (MRSA).-----

Cuadro N° 10 Preparación del master mix con 1.5 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂) para optimizar la amplificación de la región hiper variable (HVR) asociada a *mec A* en seis muestras de ADN de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA).-----

Cuadro N°11 Preparación del master mix para la amplificación de la región hiper variable (HVR) asociada a *mec A* en 88 muestras de ADN de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) y en una muestra de ADN de *Escherichia coli* como control negativo de PCR.-----

Cuadro N° 12 Preparación del master mix para la amplificación del gen de la proteína A (*spa*) en 88 muestras de ADN de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) y en una muestra de ADN de *Escherichia coli* como control negativo de PCR.-----

Cuadro N°13 Condiciones para la amplificación mediante PCR del gen de la Staphylocoagulasa (*coa*), región hiper variable (HVR) asociada a *mec A* y el gen de la proteína A (*spa*). -----

Cuadro N°14 Resultados de la amplificación del gen de la staphylocoagulasa (*coa*), la región hiper variable (HVR) asociada a *mec A* y el gen de la proteína A (*spa*) en 88 muestras de ADN de *Stapylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA). -----

Cuadro N° 15 Optimización de la concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) y la temperatura de hibridación para la amplificación de la región hiper variable (HVR) asociada a *mec A* de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) con los iniciadores HVR1 y HVR2.-----

Cuadro N° 16 Resumen de los resultados de la amplificación del gen de la staphylocoagulasa (*coa*), la región hiper variable(HVR) asociada a *mec A* y el

gen de la proteína A (*spa*) en muestras de ADN extraído a partir de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA). -----

INDICES DE FIGURAS

- Figura #1 *Staphylococcus aureus* teñidos mediante tinción de Gram.-----
- Figura #2 Morfología de colonias de *Staphylococcus aureus* en agar sangre.-
- Figura #3 Reacción de catalasa por *Staphylococcus aureus*.-----
- Figura #4 Estructura de la pared celular de las bacterias gram positivas.-----
- Figura #5 Características genéticas del *Staphylococcus aureus*.-----
- Figura #6. Mecanismo adquisición de la resistencia-----
- Figura #7 Mecanismo de inducción de la síntesis de *PBP2a* en presencia de meticilina.-----
-
- Figura #8 Aislados resistentes a meticilina por país.-----
- Figura #9. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones gen *mecA*.-----
- Figura #10. Electroforesis en gel de agarosa donde se muestra polimorfismo en el gen *coa*.-----
- Figura #11. Electroforesis gel de agarosa mostrando productos de amplificación gen *spa*.-----
- Figura #12. Electroforesis gel de agarosa 1% donde se muestran los productos de amplificación del gen *HVR*.-----
- Figura #13. Representación de polimorfismo gen *coa* y *HVR*.-----
- Figura #14. Productos de digestión y tamaños de fragmentos generados de la digestión simultanea de genes *coa*, *spa* y *HVR*.-----

INDICE DE GRAFICAS

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR: Reacción de polimerasa en cadena.

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

ICGES-LCRS: Instituto Conmemorativo Gorgas de estudios de la Salud.

mecA: gen *mec A*

HVR: Región hipervariable.

coa: gene de la staphycoagulasa.

spa: gene de la proteína A asociado al *Staphylococcus aureus*.

Hae II: Enzima de restricción *Haemophilus aegyptius* tipo II.

ADN: Acido desoxirribunucleico.

C-:Control negativo.

MgCl₂: Cloruro de Magnesio.

SARM-H: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina cepas hospitalarias.

SARM-CO: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina cepas comunitarias.

PBP's: Proteínas que unen penicilina.

PBP2a: Proteínas que unen penicilina de tipo 2^a.

TNF-*alfa*: factor de necrosis tumoral alfa.

IL:Interleucinas

dNTP's:deoxinucleosidos trifostatos.

TBE:Tris, borato y EDTA.

G+C: guanina citosina.

SCC-mec: casete cromosómico estafilocócico mec.

ORF: Marco abierto de lectura.

mM: milimolar

pb: pares de bases

LPV:Leucocidina Panton-Valentine

IACS:Infecciones asociadas a cuidados sanitarios.

CMI: concentración inhibitoria mínima.

FOX: Cefuroxime

VA : Vancomicina

DA : Clindamicina

E: Eritromicina

CIP: ciprofloxacina

Pen: Penicilina

AMX: Amoxicilina

OXA: Oxacilina

RESUMEN

Nos fue suministrado un total de 88 aislados clínicos MRSA positivos recuperados por la red de vigilancia bacteriológica del Instituto Conmemorativo Gorgas de estudios de la salud Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (ICGES-LCRSP) obtenidos en el año 2007 República de Panamá con el objetivo de caracterizar molecularmente el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina que circula en nuestro país. Se amplificó *mecA* y se demostró su presencia en el 100% de *nuestros* aislados. Posteriormente se amplificó para tres genes diferentes *coa*, *spa* y *HVR* con la finalidad de someter a la mezcla de los tres genes amplificados a una digestión con *HaeIII* para determinar patrones de restricción. Dividimos nuestros aislamientos en cuatro grupos de acuerdo a su amplificación con los diferentes genes utilizados. El grupo donde amplificaron todos los genes generaron 11 patrones de bandas diferentes. *Los patrones de banda obtenidos son reproducibles y comparables a otros estudios previos. Nuestros resultados sugieren que RFLP-PCR es una metodología de screening útil, fácil, rápida y discriminante para realizar vigilancia epidemiológica de infecciones causadas por el MRSA.*

SUMMARY

A total of 88 positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) obtained from the National Epidemiological survey library of Gorgas Commemoratives Institute of Health and Central laboratory of public Health obtained in the Republic of Panama year 2007, with the objective of firstable characterized methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* that circulates in our country. We amplificated *mecA* and demonstrated its presence in 100% of our isolates of the gene *mec A*. Then amplificated three genes (*coa*, *spa* and *HVR*). A restriction digestion of a mixture of the three amplicons produced 11 banding patterns, These patterns were reproducible and comparative to previous studies. Our results suggest that RFLP-PCR is useful, easy, faster and discriminatory technique capable of discriminate from outbreaks and is possible to used as an screening method, validate the epidemiological survey of infections caused by methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCION

El *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos de importancia a nivel mundial debido a que está asociado con infecciones adquiridas tanto en el área hospitalaria como en la comunidad (Palavencino, 2004)

En los últimos 60 años, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) ha evolucionado en forma constante a la resistencia coincidiendo con la introducción de distintos antibióticos. Esto ha generado la reemergencia de cepas multi-drogo-resistentes, las cuales están causando serios problemas de salud pública incluyendo infecciones fatales (cita).

El desarrollo de la biología molecular y a la disponibilidad de secuencias genómicas completas ha hecho posible el desarrollo de métodos diagnósticos rápidos y específicos para la detección, vigilancia y evolución de aislados de SARM.

El objetivo de este trabajo es confirmar mediante métodos moleculares la identidad de aislados de SARM suministrados por el IGES-LCRS y tipificar los mismos mediante PCR-RFLP de los amplicones generados a partir de los genes de coagulasa (*coa*), proteína A (*spa*) y la región hipervariable (*HVR*) del gen *mecA*.

El trabajo ha sido estructurado en cuatro capítulos. El primer capítulo plantea los conocimientos generales, que fue lo que motivó el interés en esta investigación. Como con una herramienta molecular, relativamente simple, podemos determinar por primera vez en nuestro país la existencia de diferentes cepas y probables mutaciones entre las mismas, estableciéndose un sistema activo de vigilancia epidemiológica para colaborar con programas de prevención, control y adecuado tratamiento.

El capítulo dos hace alusión a una revisión actualizada del marco teórico que sirve de fundamento conceptual a la investigación.

El capítulo tercero estaremos documentando los resultados, detalla el universo de la muestra y los métodos que se utilizaron para caracterizar al

Staphylococcus aureus resistente a meticilina SARM. Estos resultados los presentamos mediante fotos y tablas, que nos permitirán visualizar los mismos con mayor claridad.

Capítulo cuarto se discute aquí los resultados encontrados, se contrasta con otras investigaciones y finalmente se plantean las conclusiones y recomendaciones y la posibilidad de seguir esta rama como línea de investigación en nuestro medio.

La información suministrada en esta tesis permitirá identificar por primera vez clones y/o líneas clónales, ya que podremos comparar estas líneas con la de otros países, contribuyendo así al conocimiento científico de nuestro país. Mediante este tipo de tesis podemos incentivar a jóvenes científicos de nuestro país a seguir con estas investigaciones de manera más profunda ya que actualmente contamos con la metodología de campos pulsados.

CAPITULO I: GENERALIDADES DE LA INVESTIGACION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y SU ESTADO ACTUAL

El *Staphylococcus aureus* es una de las principales bacterias causante de infecciones de todo tipo en el mundo. Su emergencia como patógeno nosocomial refleja la baja efectividad de los programas de control de infecciones con estos microorganismos (González, 2006). Diversas investigaciones demuestran que este agente produce altos índices de morbi-mortalidad, con tasas de recurrencia de 10 al 20% y además incrementa los costos en las instalaciones de salud donde se presenta (Camarena, 2003). Esta elevada frecuencia se debe a que *Staphylococcus aureus* tiene la habilidad de adaptarse al medio debido a a la adquisición de determinantes de resistencia a los antibióticos, haciéndose residente habitual del medio hospitalario donde origina múltiples patologías.

El *Staphylococcus aureus* ha desarrollado un alto grado de resistencia a los antibióticos; primero haciéndose resistente a las penicilinas naturales mediante la producción de beta-lactamasas; luego con la detección de la secuencia genética conocida como *mecA*; responsable de proteinasas de baja afinidad por los betalactámicos, promueve la resistencia a la metilina.

Antes del inicio de este siglo; eran pocas las cepas de SARM que se detectaban en nuestro medio; pero desde hace seis años se ha notado un incremento progresivo de las mismas tanto en los hospitales como en la comunidad (Vega, 2006). Este mismo incremento ha sido detallado por Chambers en su artículo Epidemiología cambiante del *Staphylococcus aureus*, donde describe aislamientos en niños en la comunidad los cuales no han tenido ningún factor de riesgo para portar la bacteria (Chambers,2001).

Con todo lo de arriba expuesto, se nos indica que la epidemiología de las infecciones causadas por SARM han experimentado una serie de cambios tanto en su presentación clínica como en sus características microbiológicas, es por ello que las técnicas basadas en la biología molecular nos ayudan a desarrollar métodos diagnósticos rápidos y específicos. Por ende son los métodos moleculares con los que podemos investigar más profundamente los

mecanismos de evolución bacteriana a la resistencia a los antibióticos e investigar nuevos blancos para el desarrollo de una terapéutica más efectiva (Yinduo, 2007). Los métodos convencionales de cultivos tienen como desventajas que pueden estar influenciados por presión de antibióticos, medios de cultivo, concentración de cloruro de sodio, temperatura y tiempo de incubación.

El propósito de este trabajo es validar la naturaleza de los aislamientos obtenidos y compararlos entre sí y con los aislamientos de otros países, y caracterizar mediante el uso de una herramienta molecular simple, la presencia a nivel molecular de SARM en nuestro medio y así poder colaborar con el conocimiento científico de nuestro país mediante la vigilancia epidemiológica a nivel molecular que puede colaborar con programas de prevención y control en beneficio de la salud pública nacional.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente los aislados clínicos SARM utilizando *mecA*-PCR y PCR-RFLP con enzimas de restricción dirigidas contra genes *coa*, *spa* y *HVR* obtenidos por la red de vigilancia bacteriológica del Laboratorio Central de referencia en salud pública (LCRS) de la ciudad de Panamá, año 2007.

1.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a. Determinar la presencia del gen *mecA* mediante PCR en los aislados clínicos.
- b. Estandarizar la técnica de PCR-RFLP amplificando los genes *coa*, *spa* y *HVR*.
- c. Comparar los patrones de restricción de aislados objeto del estudio. Comparar los patrones de restricción con los patrones de restricción de otros estudios.

1.4 JUSTIFICACION

A partir de la década de 1980 las cepas de SARM comenzaron a diseminarse por todo el mundo constituyendo un problema en muchos hospitales, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos. Panamá tiene una incidencia alta de infecciones nosocomiales causadas por *Staphylococcus aureus*. Dada la importancia que presenta este patógeno para la salud pública y debido a los cambios epidemiológicos y moleculares que se vienen produciendo, surgió el interés en determinar mediante diagnóstico molecular la presencia del gen *mecA* en cepas clínicas diagnosticadas fenotípicamente como positivas. La utilización de este método de detección nos permitirá validar la naturaleza de los aislados previamente reportados. Además, mediante el PCR-RFLP podremos identificar clones y/o líneas clonales para hacer los estudios genéticos de los aislados obtenidos de pacientes durante el curso de una infección, como también comparar nuestros aislados con los de otros países.

Los resultados encontrados en este primer trabajo, serán de utilidad para el personal médico, microbiólogos y epidemiólogos de nuestro país, pues se demostrará sin lugar a dudas, la verdadera incidencia de los SARM y evaluará a la vez la calidad diagnóstica de nuestros métodos, contribuyendo al conocimiento científico de nuestro país. Además nos ayudará a conocer marcadores epidemiológicos del SARM que son de utilidad diagnóstica. Debido a que la metodología empleada es rápida, fácil y reproducibles podremos mejorar las medidas de prevención mediante implementación diagnóstica de esta técnica ya optimizada conociendo primeramente cual o cuales genes nos serán mas útiles para su discriminación, mejorando el control, manejo y cuidado de los pacientes, evitando el desarrollo de mutantes nosocomiales en nuestro sistema de salud pública. (como) VERIFIQUE

CAPITULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 GENERALIDADES DEL *Staphylococcus aureus*.

El género *Staphylococcus* se ha incluido tradicionalmente en la familia *Micrococcaceae* junto con los géneros *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*, de escasa importancia Clínica (1) (Scheleifer et al, 1986).

Estudios recientes en homología genética mediante secuenciación de ADN, hibridación ADN-rARN, secuenciación y comparativa de 16S rARN han demostrado que el género *Staphylococcus* y *Micrococcus* están poco relacionados. El género *Staphylococcus* se ha incluido junto con el género *Gemella*, *Micrococcus* y *Salinicoccus* en la familia *Staphylococaceae*, dentro del orden *Bacillales*, con los que comparte mayor similitud genética (www.bacterio.cict.fr) por internet??

Existen 42 especies diferentes (www.bacterio.cict.fr). Algunas de ellas forman parte de la flora microbiana normal de piel y mucosas del humano y otras se encuentran entre la flora normal de animales mamíferos y aves. Los *Staphylococcus* que más se asocian con enfermedades en el ser humano y animales son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus warneki*. El *Staphylococcus aureus* es la especie de mayor importancia clínica y coloniza piel y fosas nasales donde alrededor de un 20% de la población está siempre colonizada, 60% son portadores intermitentes y 20% nunca portan el microorganismo (Foster, 2004).

El *Staphylococcus aureus* es un coco gram positivo que miden entre 0.5 – 1.5 μm de diámetro, se agrupan en parejas y en tétradas, en forma característica se dividen en más de un plano para formar racimos irregulares de donde procede su nombre “*Staphylé*” que significa racimos de uvas. Nombre fue propuesto por el cirujano escocés en 1880 Alexander Ogdson.

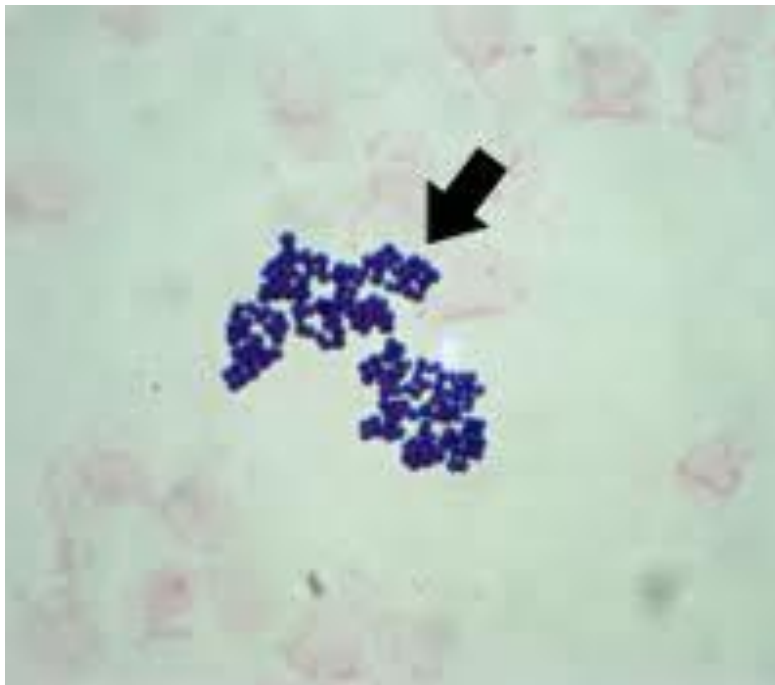


Figura #1 *Staphylococcus aureus* teñido mediante tinción de gram) tomada de sitio internet

Son bacterias inmóviles, que no forman espores, generalmente no poseen capsulas y salvo por raras excepciones son anaerobias facultativos.

En medios de cultivo no selectivo, la mayoría de las especies crecen después de 18-24 horas de incubación formando colonias de 1-3 mm de diámetro. En medios sólidos forman colonias redondas, lisas prominentes y brillantes. Las colonias son doradas debido a la producción de carotenoides durante el crecimiento, sin embargo, hay cepas no pigmentadas. Casi todas las cepas tienen un halo de beta hemólisis o hemólisis completa alrededor de la colonia, cuando crecen en medios de cultivo con sangre. La morfología colonial es una característica muy útil que ayuda a diferenciar inicialmente la especie *Staphylococcus aureus* de las otras especies de *Staphylococcus* (ver figura #2)

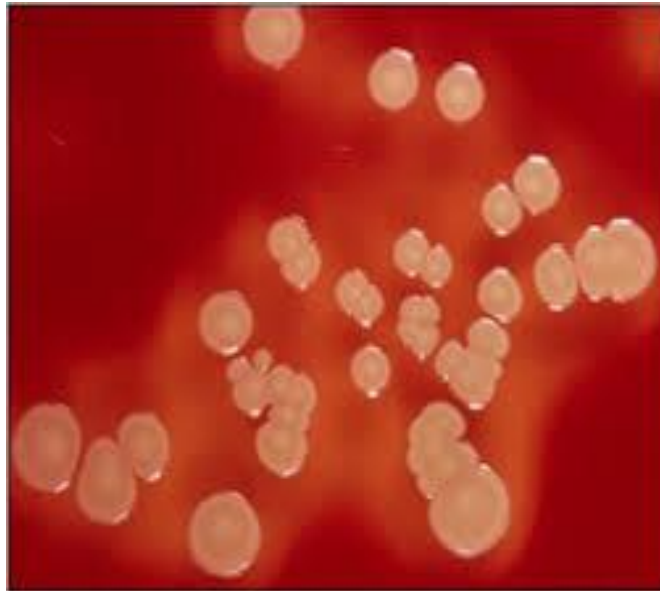


Figura #2 Morfología de colonias de *Staphylococcus aureus* en agar sangre. Tomada del

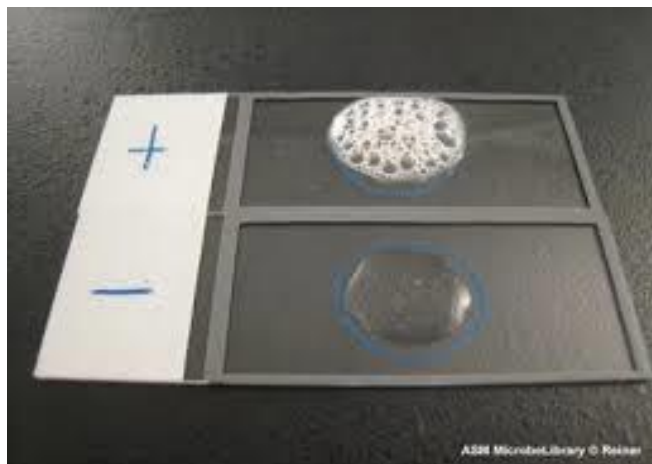


Figura #3 Reacción de catalasa para *Staphylococcus aureus*. Tomada de

Entre sus características bioquímicas destacadas esta la producción de catalasa, una enzima que le permite desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno libre. Esta característica se utiliza para diferenciar al género *Staphylococcus* (catalasa positivo) de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativo) (Waldvogel, 2000) (Peacock, 2005). Estos resultados los presentamos mediante fotos y tablas, que nos permitirán visualizar los mismos con mayor claridad. (ver figura #3)

La principal característica que diferencia al *Staphylococcus aureus* de las demás especies de *Staphylococcus* es la producción de coagulasa, enzima que le permite a la bacteria coagular el plasma. Las demás especies no producen esta enzima (coagulasa negativo) y de forma genérica se agrupa con esta denominación a todas las especie *Staphylococcus* diferentes de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo. (8-11) (Bannerman, 2007) (Eikens, 2005).

Como características generales podemos señalar que el *Staphylococcus aureus* son bacterias muy resistentes al calor y a la desecación que pueden crecer en medios con elevada salinidad (7.5% NaCl) esto es de suma importancia epidemiológica.

2.2 ESTRUCTURA

La capacidad patogénica del *Staphylococcus aureus* está dada por un conjunto de componentes de pared celular y productos extracelulares que juegan un papel individual o grupal en la invasión del tejido determinando la interacción con las células del hospedero.

Su pared celular contiene peptidoglicano y ácido teicoico, como componentes fundamentales. El peptidoglicano representa el 50% del peso de la pared celular y le proporciona forma y estabilidad al microorganismo además que tiene actividad de tipo endotoxina las cuales estimulan la producción de monocitos y macrófagos de citoquinas y quimioquinas (TNFalfa, IL-10 y IL-8), activa el complemento y la agregación plaquetaria (Founier, 2005). Está compuesto por una matriz de polisacárido compuesta por subunidades N-acetilmurámico unidos mediante enlaces Beta 1-4. Adicionalmente las cadenas de peptidoglicano está entrelazados mediante la unión de dos subunidades de ácido N-acetilmurámico que forman un puente intercatenario de 5 glicinas (pentaglicinas).

Los ácidos teicoicos representan el 40% del peso de la pared, son polímeros de ribitol y N-acetil-glucosamina (polisacárido A) y son específicos de especies; están unidos en forma covalente al peptidoglicano o ligados a los lípidos de la membrana celular. Los ácidos teicoicos median la unión del *Staphylococcus aureus* a las superficies mucosas mediante uniones específicas a la fibronectinas (15) (Murray, 2005). El polisacárido aumenta la virulencia del *Staphylococcus aureus* ya que le confiere resistencia a la fagocitosis por enmascaramiento de opsoninas como molécula del complemento (fragmento C3b). La cápsula impide la interacción de C3b o los anticuerpos depositados y su respectivo receptor en las células fagocíticas.

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* están recubiertos uniformemente por la proteína A que tiene la habilidad de unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas inhibiendo la opsonización y la fagocitosis, esta es utilizada como una prueba específica de aglutinación con anticuerpos monoclonales en la identificación de *Staphylococcus aureus*.

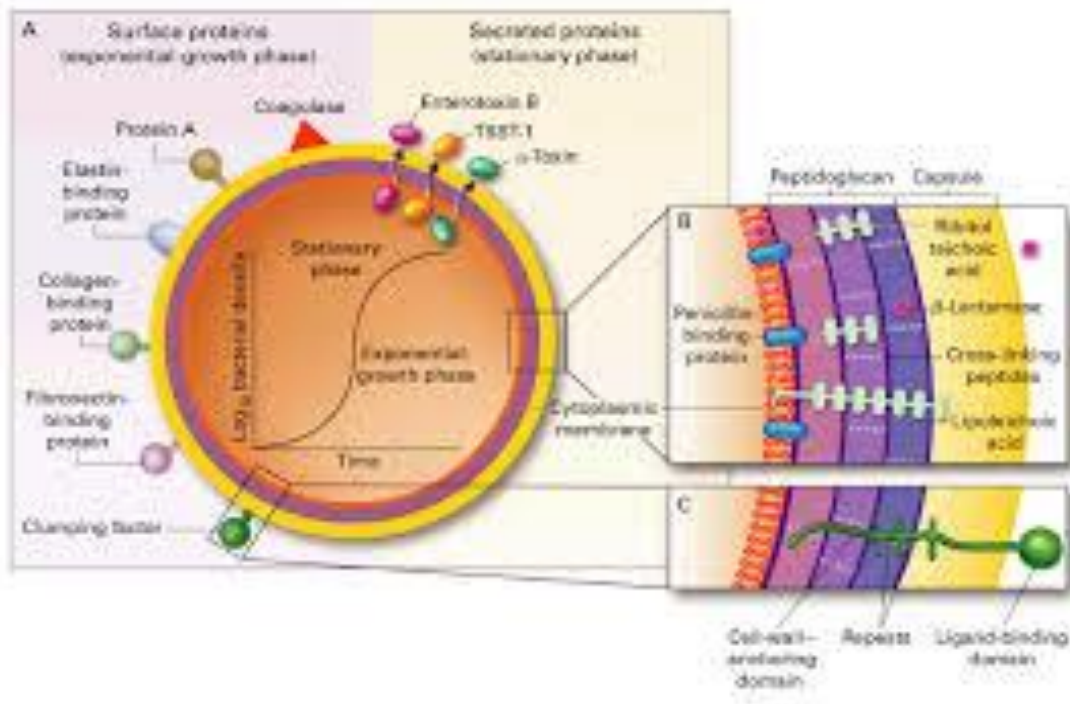


Figura #4. Foto tomada de: <http://www.alloccasionsgroups.com/upload/documents/AIMS/power%20points/1400%20kav.pdf>

Coagulasa es otra de las proteínas de pared y puede encontrarse ligada a la célula (coagulasa ligada o clumping factor) o de forma libre en el medio. Facilita la agregación bacteriana mediante unión a fibrinógeno.

2.3 ENZIMAS Y TOXINAS

Son sustancias que producen su acción en zonas próximas al foco infeccioso. Actúan destruyendo el tejido y facilitando la diseminación de la infección al tejido adyacente (Bannerman, 2000). La catalasa degrada el peróxido de hidrogeno protegiendo al microorganismo durante la fagocitosis, la coagulasa que interviene en la formación del coágulo, convirtiendo fibrinógeno en fibrina, facilitando los procesos sépticos y permitiendo la formación de abscesos. Existe una fuerte correlación entre la producción de coagulasa y la virulencia de la cepa. La hialuronidasa degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo y facilita entonces la propagación de la infección. Penicilinas que es una beta lactamasa que mediante hidrolisis de su anillo betalactámico inactiva la penicilina. Las nucleasas hidrolizan el ADN y RNA.

Las toxinas son proteínas capaces de producir su acción en zonas distantes del foco infeccioso, su expresión está regulada por un gen accesorio regulador y pueden ser codificadas por el ADN cromosómico o plásmidico. Entre las más importante tenemos a la hemolisina que poseen capacidad hemolítica y citolítica, donde intervienen en el desarrollo de edema y daño tisular como consecuencia de cambios inducidos en las células endoteliales y los consiguientes cambios en el balance iónico.

Toxinas exfoliativas o epidermolíticas que actúan destruyendo desmosomas del estrato granuloso de la epidermis. Poseen actividad proteasa serinica lo que desencadena la exfoliación.

En 1932 se describió un factor de virulencia que más se ha relacionado ahora con cepas de SARM-C y este es *LPV* (leucocidina Panton-Valentine). Esta toxina específica de *S. aureus* tiene actividad leucocitotóxica y dermonecrótica debido a la presencia de dos componentes: la subunidad *luk-S PV*, codificada por el gen *luk-PV*, que se une al receptor de los leucocitos y los macrófagos, y la

subunidad *lukF-PV*, codificada por el gen *lukF-PV*, que produce la apertura de los canales de calcio de la membrana celular, altera la permeabilidad de esta y provoca la lisis celular (Koning et al, 1995).

2.4 EPIDEMIOLOGÍA

Su localización más frecuente es la nasal (Coello, 1994), donde el principal reservorio lo constituye el hombre enfermo o portador. La transmisión ocurre por contacto directo entre el contacto y el portador colonizado, según estudio longitudinal realizado por Frank et al las ratas de portadores persistentes son ratas de 20-30%, 30% de portadores intermitentes y 50% de las personas nunca lo portan. Porcentajes altos son observados entre los siguientes grupos de riesgos como son drogadictos intravenosos, diabéticos dependientes de insulina, pacientes con enfermedades dermatológicas, catéteres intravasculares y trabajadores de la salud (Chambers, 2001). Diferentes estudios describen que los portadores nasales de SARM tienen mayor riesgo de infección nosocomial por este microorganismo lo que pueden presentar una mayor morbo- mortalidad comparados con grupos de pacientes infectados con cepas sensibles de *Staphylococcus aureus* (Romero-Vivas, 1995), debido a esto debemos mantener la prevalencia de SARM baja.

Según estimaciones recientes hay más de 400,000 hospitalizaciones por infecciones por *Staphylococcus* que ocurren anualmente en los Estados Unidos (Nubel et al, 2008), de las cuales 19,000 son mortales (Boucher et al. 2008). En Latinoamérica, países como Brasil reportan de 50 a 60% de sus infecciones son por *Staphylococcus aureus*. Argentina reporta prevalencia de 50% y Colombia la prevalencia por SARM es de 52% (Sola et al. 2007) (Pérez, 2003. Panamá reportó el 28% de cepas resistentes a metilina hospitalarias en año 2004 (Guzmán-Blanco et al, 2009).

En la década de los noventa el *Staphylococcus aureus* fue la causa más común de infecciones por heridas quirúrgicas (10-28%) y por neumonías de pacientes ventilados (15-40%) y la segunda causa por bacteremias (10-21%) en los hospitales a partir de catéteres (Pujol, 1994). Con el surgimiento de las

cepas de SARM se renovó la atención en esta bacteria, no solo por su complejidad en el tratamiento de las infecciones, sino por la presentación de casos cada día más severos y su rápida capacidad de diseminación a nivel hospitalario y en la comunidad. Esta rápida diseminación y el probable incremento en la patogenicidad sugieren que existe la presencia de determinantes de virulencia diferentes a su contraparte sensible.

Actualmente, a las infecciones nosocomiales y comunitarias, se une una tercera categoría denominada “infecciones asociadas a cuidados sanitarios” (IACS); en la que se incluye pacientes no hospitalizados que mantienen un estrecho contacto con el sistema sanitario y que son un grupo especialmente susceptible a la adquisición de infecciones por SARM.

2.5 FISIOPATOGENIA

En su artículo *Staphylococcus aureus* un patógeno bien armado, Gordon Archer nos explica que el *Staphylococcus aureus* es un patógeno muy virulento, que es la causa más común de infecciones a nivel hospitalario, su gran éxito se debe a su habilidad de causar una amplia gama de infecciones como resultado de sus extensos factores de virulencia. El aumento en la resistencia a agentes antibacterianos, aunado a su aumento en la prevalencia como patógeno nosocomial y ahora como patógeno comunitario es la mayor preocupación de los sistemas de salud pública (Archer, 1991).

La patogenicidad de las infecciones por *Staphylococcus aureus* se produce al combinarse los factores de virulencia bacteriana con una disminución de las defensas del huésped. En este sentido debemos considerar que la versatilidad de producir patología del *Staphylococcus aureus* es amplia, ya que puede producir enfermedad por toxina o superantígenos, invadir cualquier órgano o tejido, originar supuración, necrosis tisular, trombosis vasculares y bacteremias. Sin lugar a dudas es el microorganismo con mayor capacidad de originar metástasis por vía hematológica. Le es posible crecer en citoplasma celular, formar biopelículas y originar bacteremias persistentes o infección crónica o también permanecer quiescente y reactivarse meses o años más tarde.

Coloniza piel y mucosas, desde donde produce reinfecciones, coloniza el entorno y se extiende a otros pacientes. En esta acción patogénica, intervienen los componentes de la pared celular y la producción de enzimas y toxinas favorecedoras de la invasión tisular, además de su capacidad de diseminarse y multiplicarse en los tejidos del huésped.

Entre los componentes de la pared celular tenemos al peptidoglicano, que representa el 50% del componente básico de la pared del *S. aureus*, el cual debido a sus propiedades de presentar actividad endotóxica puede estimular la liberación de citocinas tipo uno por macrófagos y activar la agregación de plaquetas. El ácido teicoico o polisacárido A y lipoteicoico, que son polímeros peculiares de ribitol y participan en la adherencia específica de bacterias gram positivas a la superficie de la mucosa además de conferir rigidez y elasticidad a la pared celular de los *Staphylococcus*. Estos tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos.

2.6 CUADROS CLINICOS

El *Staphylococcus aureus* puede producir una gran variedad de procesos infecciosos que van desde una infección cutánea benigna hasta enfermedades sistémicas potencialmente mortales. Se conocen cinco fases en la patogenia de las infecciones por *Staphylococcus aureus* que son: 1 colonización, 2 infección local, 3 diseminación y/o sepsis, 4 infección metastásica y 5 toxinosis. Aproximadamente 30% de los individuos sanos están colonizados por *Staphylococcus aureus*, usualmente en fosas nasales pero también en vagina y área perianal. La infección por *Staphylococcus aureus* se produce tras lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la penetración del microorganismo hasta los tejidos profundos. Desde estos puntos puede producir bacteremias y cuadros metastásicos. Las infecciones por *S. aureus* generalmente son supurativas y tienden a la formación de abscesos. (Pascual, 2005).

TABLA N° 1 Enfermedades donde el agente causal es *Staphylococcus aureus*.

Enfermedades causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	
Enfermedad	Descripción
Enfermedades mediadas por toxinas	
Síndrome de la piel escaldada por estafilococo	Es un síndrome caracterizado por la descamación diseminada del epitelio de recién nacidos y lactantes; No se encuentran microorganismos o leucocitos en las ampollas.
Intoxicación alimentaria	Sucede después de haber ingerido alimentos con la toxina termoestable. Se caracteriza por la presencia de vómitos intensos, diarrea y cólicos que inician entre 2 y 6 horas después de la ingesta. La resolución es rápida (menos de 24 h).
Síndrome de choque tóxico estafilocócico	Intoxicación multisistémica. Paciente con fiebre, hipotensión, vértigo ortostático, exantema maculo-eritematoso, vómito en muchas modalidades, diarrea, falla renal y una variedad de manifestaciones clínicas. Mortalidad elevada en ausencia de tratamiento. Por algún tiempo se asoció con tampones femeninos hiperabsorbibles.
Infecciones supurativas	
Absceso cutáneo	Es una acumulación de pus que puede darse en piel y mucosas. También puede darse en diferentes órganos (pulmón, hígado, riñón y cerebro) mediante la diseminación bacteriémica. Los abscesos deben desbridarse y la infección del material protésico requiere el retiro del mismo.
Impétigo	Infección cutánea localizada caracterizada por la presencia de pústulas sobre base eritematosa. Se da preferentemente en niños y en zonas expuestas, en especial la cara.
Foliculitis	Es una infección restringida a los orificios de los folículos pilosos y se acompaña por la presencia de lesiones dolorosas, rojizas y pequeñas sin síntomas sistémicos.
Ántrax (forunculosis)	Son piodermas profundos que se presentan como lesiones elevadas, firmes, dolorosas y con centros necróticos que contienen material purulento.
Celulitis de cara y cuello	En este grupo se incluye la celulitis preseptal o preorbitaria, generalmente existe antecedente de lesión cutánea, se presenta con edema, dolor eritema local y fiebre.
Hidradenitis supurada	Es la infección de las glándulas sudoríparas apócrinas bloqueadas. Se da en las áreas intertriginosas (axila, ingle, áreas perineales). Existe dolor, edema y eritema,

	usualmente sin fiebre.
Mastitis	Es la infección de las glándulas mamarias asociada a parto y lactancia. Se encuentra edema, tumefacción, dureza y eritema en las mamas.
Infección de heridas.	Se dan por soluciones de continuidad en la piel, pueden aparecer en el periodo postoperatorio si no se sigue una correcta técnica aséptica y existe enrojecimiento, tumefacción, dolor y presencia de drenaje sanguinolento turbio.
Bacteriemia	Es la diseminación de bacterias por el torrente sanguíneo, secundaria a una infección localizada en otra parte o por acceso directo a través de catéteres, terapia intravenosa o jeringas (drogadicción). Al distribuir organismos, se vuelve en la causa de infección de órganos internos.
Endocarditis	Es la principal complicación de la bacteriemia. Daños hacia el revestimiento endotelial del corazón. También afecta a las válvulas cardíacas. Pueden auscultarse soplos.
Neumonía y empiema	Infestación pulmonar, de predominio en pacientes de la tercera edad. Pueden originarse por aspiración o como complicación de la bacteriemia. La neumonía por aspiración suele ser secundaria a infección por otro agente etiológico.
Osteomielitis	Infección y destrucción ósea, en especial en la metáfisis de los huesos largos de los niños y la columna vertebral en adultos mayores.
Artritis séptica	Articulación eritematosa dolorosa con material purulento en el espacio articular.
Meningitis	Infección del sistema nervioso, se presenta en pacientes con antecedentes de traumatismos, cirugías, inmunodeficiencia, neoplasias malignas e hidrocefalia.
Peritonitis	Infección del peritoneo, el grupo de riesgo son los pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria.
Pericarditis	Infección del pericardio. Sucede como complicación de la endocarditis estafilocócica o por trauma penetrante en el tórax.
Piomiositis	La piomiositis es la infección de los músculos esqueléticos, en general, secundario a trauma o diseminación de infecciones subcutáneas. Aunque es un evento inicialmente descrito en forma más frecuente en áreas tropicales puede presentarse en cualquier zona climática e involucra la incapacidad funcional de la extremidad.

Síndrome de coagulación intravascular diseminada	Mediada por las coagulasas estafilocócicas. Es una complicación de la toxina de choque estafilocócico potencialmente mortal
--	---

TABLA #1 Infecciones o síndromes donde el *Staphylococcus aureus* es un patógeno tomado de *Staphylococcus aureus* - Wikipedia, la enciclopedia libre https://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus

2.7 CARACTERISTICAS GENETICAS

Staphylococcus aureus tiene un genoma de un tamaño aproximado de 2800kb, contiene 32% de G+ C y 83% es codificante, formado por un único cromosoma circular en el que se encuentran elementos genéticos móviles como son plásmidos, bacteriófagos, transposones y secuencias de inserción (Pattee,1990). Contiene un genoma central y uno accesorio, el genoma accesorio puede encontrarse integrado al cromosoma bacteriano como material extra-cromosómico, este representa un grupo de diversos genes que codifican proteínas requeridas para la adaptación de la bacteria a diferentes condiciones ambientales. Los genes accesorios son transportados en elementos genéticos móviles, que poseen concentraciones diferentes de G+C a la del DNA cromosómico pues la mayoría provienen de otras especies bacterianas (Linday and Holden, 2004). La plasticidad del genoma del *Staphylococcus aureus* ha permitido obtener una gran cantidad de información genética, lo ha permitido explicar los mecanismos de transferencia genética entre las cepas mediante procesos de conjugación, transducción, transformación y movilización mediante plásmidos conjugativos (Skurray, 1997).

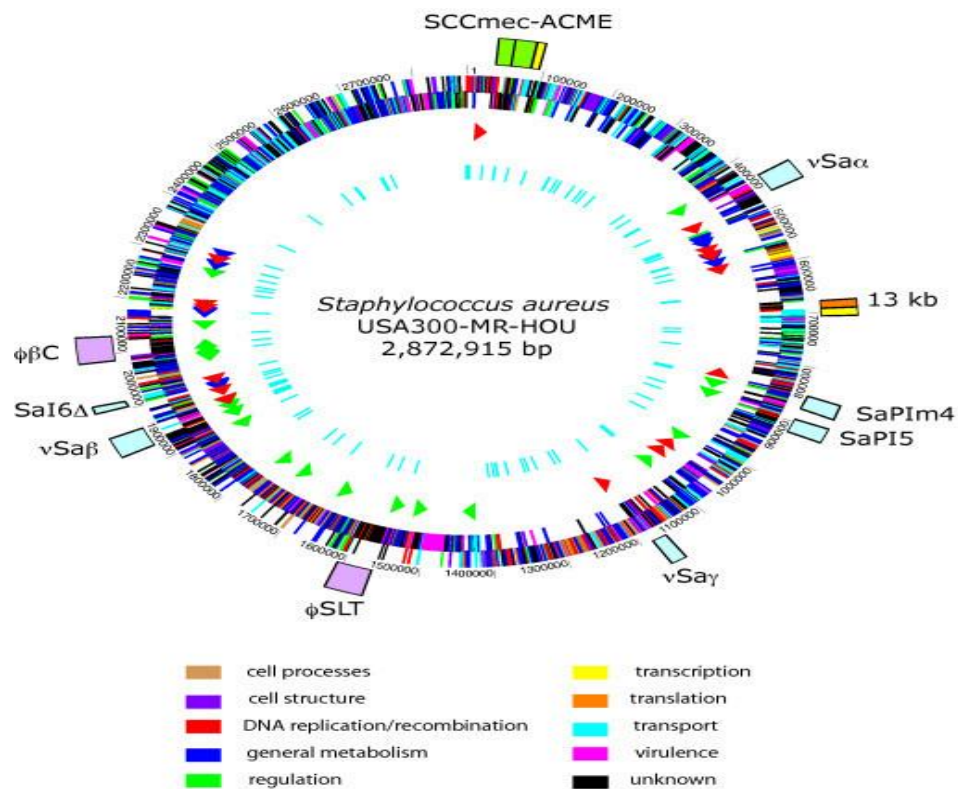


Figura #5 tomada de www.google.com/url

2.8 RESISTENCIA ANTIBIOTICA

La aparición de bacterias resistentes a los antibióticos se ha relacionado con el excesivo uso de determinados antibióticos. El estudio de la genética de la resistencia a los antibióticos lleva a concluir que cada antibiótico tiene la capacidad de alterar de manera inexorable su micro ambiente y crear ventajas selectivas para microorganismos resistentes. Los antibióticos pueden ejercer su acción en forma bacteriostática mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular, inhibiendo la síntesis de proteínas actuando a diferentes niveles en las subunidades ribosomales 30S y 50S y bloqueando la síntesis de ácidos nucleicos o bactericida mediante la destrucción de la viabilidad celular.

Los beta- lactámicos son los antibacterianos más utilizados, tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario debido a sus cualidades: buena actividad bactericida, alta eficacia, escasa toxicidad y amplio margen

terapéutico, su punto en contra es que son ácidos orgánicos lo que dificulta su difusión a través de las membranas. Actúan sobre el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, inhibiendo la última etapa de su síntesis e induciendo su destrucción. Para ello, deben llegar a su diana de actuación, las PBP's o proteínas que se unen a las penicilinas, situadas en la parte externa de la membrana citoplasmática. La inactivación de las PBP's se hace por formación de complejos covalentes con los beta lactámicos. El efecto de un determinado beta lactámico depende de la afinidad que tenga por las diferentes PBP's.

A medida que se van introduciendo nuevos antibióticos, una bacteria como el *Staphylococcus aureus* pueden ir desarrollando diferentes mecanismos para neutralizarlos, ya que se adaptan a las condiciones ambientales (Lowry, 1998) modifican su sensibilidad a los antimicrobianos y regulan sus factores de virulencia. Las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos, mediante mutación de sus genes o por adquisición de genes resistentes de otras bacterias o virus. Esta transferencia puede ser por transducción o por transformación cuando el intercambio genético se realiza entre bacterias de la misma especie o de especies genéticamente muy próximas, y por conjugación cuando se intercambian genes entre diferentes especies, a través de **pilis conjugativos**.

2.9 EMERGENCIA Y EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN

Staphylococcus aureus

El *Staphylococcus aureus* fue el primer microorganismo en poner en manifiesto la resistencia a los antimicrobianos, ya en los primeros años de la década de los 40 se comienzan a describir aislamientos de *S. aureus* con resistencia a la penicilina debido a la producción de betalactamasa (Barber, 1947).

Ya en la década de los años 50 a medida que se iban adquiriendo resistencias a los antibióticos conocidos, se fueron introduciendo en la práctica clínica otros nuevos antibióticos. Ya en 1957, muchas cepas de *S. aureus* presentaban resistencia múltiples a penicilina, estreptomina, tetraciclina,

cloranfenicol y eritromicina (Shanson, 1981). El año 1959 se introduce la meticilina, penicilina semisintética que permite volver a tener el control sobre las infecciones por *S. aureus*.

Muchos científicos están de acuerdo a que SARM emergió en 1960, cuando adquirió el gen *mec A* (Hiramatsu, 2001), el origen de *SCCmec* es desconocido, pero se conoce que este elemento está ampliamente distribuido en los *Staphylococcus*, incluyendo el *Staphylococcus aureus*, ellas no han sido encontrada en ningún otro género de bacterias (Crisostomo, 2001). *SCC mec* está integrado cerca el origen de replicación del *Staphylococcus aureus*, esta localización ha sido crítica en proveer al SARM con la habilidad de adquirir genes de resistencia a los antibióticos (Hiramatsu, 2001).

Ya en 1961 aparecen las primeras cepas resistentes a meticilina aisladas en Inglaterra por Jevons y Knox (Jevons, Knox, 1961). Dos años más tarde, aparece el primer brote epidémico de infección nosocomial por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en el reino Unido (Stewart, 1963) presentaban resistencia intrínseca a todos los beta láctamicos incluidas las cefalosporinas y carbapenemes.

A finales de los años 80 se encuentran cepas de *S. aureus* que combinan la resistencia a meticilina con la resistencia a otros muchos grupos de antibióticos (Schaeffler, 1989). En los últimos tiempos se han documentado casos de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a glucopéptidos (Hiramatsu, 1997) y recientemente se han descrito casos en Estados Unidos de cepas de *S. aureus* con resistencia de alto nivel a vancomicina (Tenover, 2004). Esta rápida diseminación y el probable aumento de la patogenicidad sugieren la presencia de determinantes de virulencia diferentes a su contraparte sensible (Lowry, 1998).

Crisóstomo y colaboradores han estudiado cepas de *Staphylococcus aureus* con varios métodos para estudiar la similaridad genética de fondo en clones epidémicos tempranos y contemporáneos, ellos encontraron que los aislados tempranos de SARM se parecen a los aislados MSSA en sus características

fenotípicas y genotípicas, sugiriendo que estos aislados MSSA probablemente representen la progenie de la cepa que sirvió como recipiente para el primera cepa resistente a meticilina en Europa; sin embargo, muchos investigadores están de acuerdo en que los aislados MRSA no son descendientes de un clon y que la transferencia horizontal de SCC dentro de aislados MSSA epidémico de diferentes linajes pueden haber jugado un rol significativo en la evolución de MRSA.

Robison y Enright (2003) propusieron modelos evolucionarios de la emergencia de MRSA basados en modelos moleculares donde ellos proponen que SARM emergió de al menos 20 intentos la adquisición del gen *mecA*.

2.10 MECANISMO DE RESISTENCIA EN *Staphylococcus aureus*

Se han descritos diferentes tipos de mecanismos de resistencia de *Staphylococcus aureus* a los beta lactámicos como es la resistencia mediada por beta lactamasa, el fenómeno de tolerancia, la resistencia a meticilina y esta es la materia de estudio de nuestra tesis. Esta resistencia implica resistencia intrínseca a todos los betas lactámicos, incluidas cefalosporinas y carbapenemes. Puede ser debida a varios mecanismos, en función de que contengan o no el gen *mecA*. Este mecanismo de resistencia fue descubierto en 1981 con la identificación de alteraciones en la afinidad de las proteínas que se unen a las penicilinas o PBP's (penicillin binding proteins) (Hayes, 1981).

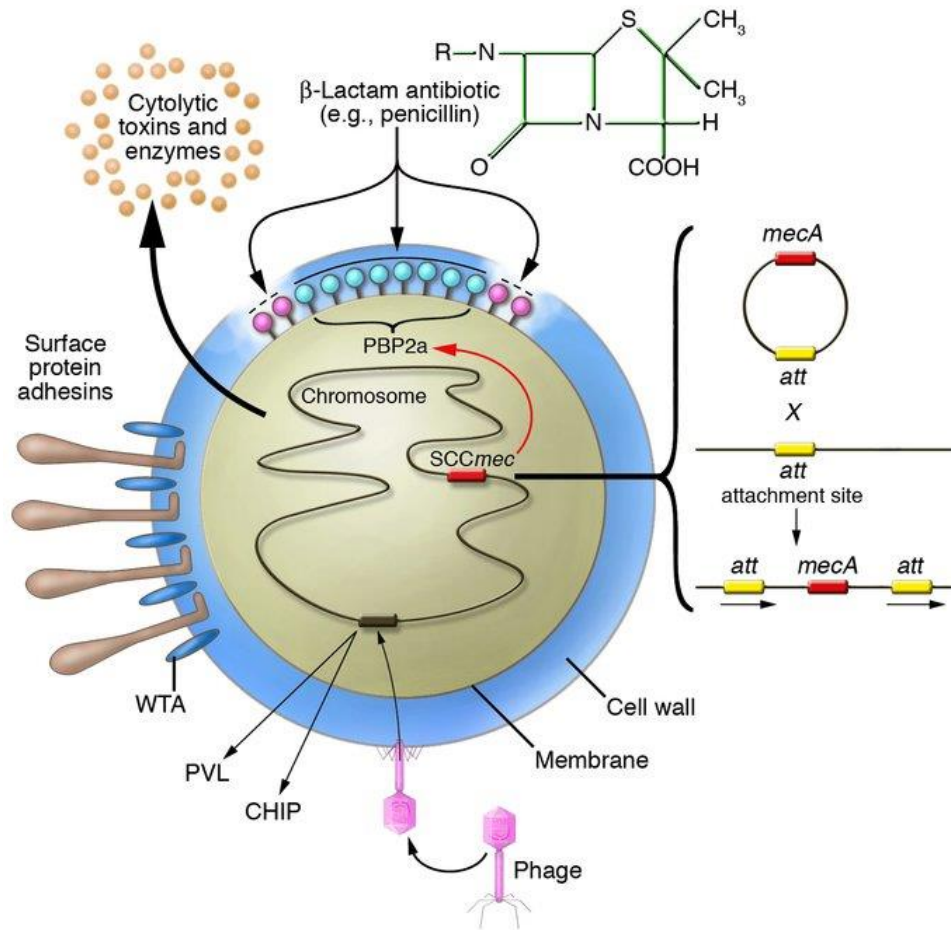


Figura #6 como SARM adquiere la resistencia a la metilina. Tomada de

Las PBP's son enzimas localizadas en la membrana bacteriana que catalizan las reacciones de transpeptidación del peptidoglicano durante la síntesis de la pared celular (Berger-Bachi, 1994). Las cepas de *Staphylococcus* se caracterizan por producir al menos cuatro PBP's (1 a 4) que son inhibidas por los betalactámicos, incluida la metilina. Las cepas SARM se caracterizan por desarrollar una PBP de baja afinidad por los antibióticos betalactámicos, denominada PBP 2^a. Esto le permite que cuando las PBP's 1, 2, 3 y 4 están inhibidas por la presencia de metilina, la PBP 2^a continúa activa manteniendo la síntesis de la pared celular (De Lencastre, 1991). La PBP 2^a es diferente del resto de las PBP's ya que su lugar activo se bloquea la unión a cualquier beta lactamico, pero permite que la reacción de la transpeptidación continúe su proceso (Lim, 2002). Las cepas de *Staphylococcus aureus* que son resistentes a metilina por este mecanismo, lo son también a todos los beta lactámicos, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos.

2.11 GEN *mecA* y SSC *mec*

El gen *mecA* está ampliamente distribuido tanto en *Staphylococcus aureus* como entre otras especies de estafilococos coagulasa negativa resistentes a meticilina. Distintas hipótesis del origen del gen *mecA* se han descrito. En un principio Beck et al postularon que se podían haber originado de una especie estafilocócica distinta de *S. aureus* (Beck, 1986), posteriormente Archer en 1994 sugirió que pudieron haber adquirido de algunas especies de estafilococos coagulasa negativo, sin embargo, algunos estudios han encontrado homología del 88% entre el gen *mecA* de *S.aureus* y el gen *mecA* de *S. sciuri* (Couto, 1996). En vitro se ha podido comprobar que el gen *mecA* al introducirlo en *S.aureus*, participa en la síntesis de la pared celular produciendo resistencia de alto nivel a los beta lactámicos (Severin, 2005). También se ha podido demostrar transferencia del gen *mecA* desde *S epidermidis* a *S. aureus* (Wielders, 2001).

El determinante genético de resistencia a meticilina es el gen *mecA*, localizado en el cromosoma bacteriano y que codifica para la síntesis de la PBP 2^a. Esta secuencia cuenta con dos genes reguladores: el gen *mecR1* o gen regulador de la señal de transducción del gen y el gen *mec1* que es el que codifica la proteína represora de la transcripción del gen *mecA* (Archer et al., 2001).

En presencia de la meticilina la proteína la proteína transmembranal detecta el antibiótico. La transcripción del gen *mecA* se produce cuando el beta lactámico llega a la célula y se une al receptor-dominio de unión a penicilina de la membrana citoplasmático codificado por el gen *mecR1*, desencadenando la liberación de una subunidad que presenta actividad metaloproteasa, la cual degrada el inhibidor que se encuentra asociado al promotor del gen *mecA*, permitiendo la transcripción y traducción de la PBP2a. De esta manera queda libre el operador de *mecA* siendo posible la expresión de PBP 2^a la cual será transportada a la membrana celular para cumplir su función de la síntesis de la pared celular. (Zhang, 2001). (presencia de meticilina) (Lowy,2010).

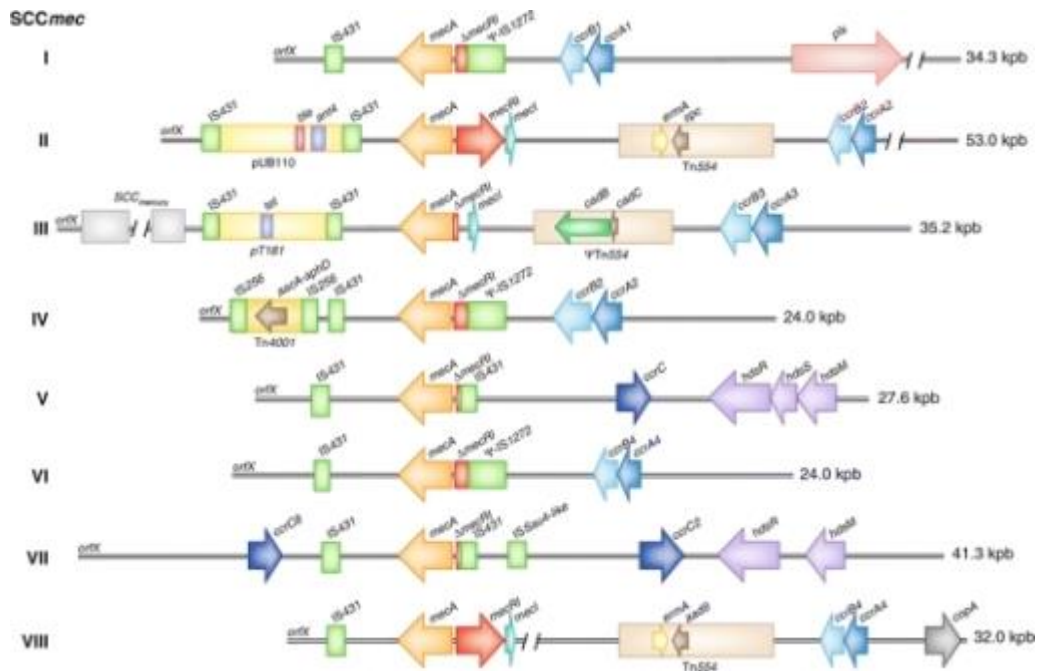


Figura #7. Mecanismo de inducción de la síntesis de PBP2a en presencia de meticilina tomada.

http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2929429_18_2010_389_Fig4_HTML&req=4

2.12 HISTORIA DE LA RESISTENCIA *Staphylococcus aureus*

El uso de la penicilina comenzó en 1940, para 1944 luego de la segunda guerra mundial el 95% de los *Staphylococcus aureus* eran sensibles a esta droga, sin embargo, al comenzar la década del 50 esta sensibilidad ya se había reducido al 50%, debido a la síntesis de betalactamasa por parte del *Staphylococcus aureus*. Para contrarrestar el efecto de estas enzimas en 1960 surge la meticilina droga semi-sintética que resiste la acción de la enzima penicilinasa estafilocócica. En 1961 a tan sólo un año de iniciada su utilización surgen las primeras cepas resistentes a la meticilina (Jevons, 1961) en el año 1963 es descrito el primer brote epidémico de infección nosocomial en el Reino Unido (Stewart, 1963). Desde entonces se han descrito su diseminación en

diversos países, pudiéndose documentarse diseminación global de diversos clones epidémicos.

En la década de 1970, se informan brotes nosocomiales en diferentes países europeos como Reino Unido, Dinamarca, Francia y Suiza. En Estados Unidos comienzan a aislarse cepas SARM durante estos años y no será hasta los ochentas cuando se constituyan en una importante causa de infección en los hospitales. Esta diseminación fue favorecida por falta de medidas higiénicas, incremento en la presión selectiva por alto consumo de antibióticos en dichos centros.

Para finales de los setentas se observó una disminución en la frecuencia de aislamientos SARM en Europa debido presumiblemente a la mejora en las prácticas médicas, control de infecciones hospitalarias y uso adecuado de antibióticos.

En las décadas entre 1980 y 1990 se produce una segunda onda de infección por SARM en hospitales europeos, Australia y Estados Unidos, donde en 1981 se identifica en Londres la cepa epidémica EMRSA-1 con fagotipos y fenotipo de resistencia similares a los de la cepa epidémica descrita en Australia (Cookson,1988).

En la década del 90 primero en Australia, luego en Nueva Zelanda, Estados Unidos y Canadá comienzan a circular en el mundo cepas de *Staphylococcus aureus* con características similares a las anteriores en cuanto a su resistencia a meticilina pero conservando la sensibilidad a la mayoría de las drogas anti estafilocócicas, afectando esta vez a individuos sin factores de riesgo descrito.

En Estados Unidos aislamientos aumentaron de 2.4% a 29% y en Europa se registraron aumentos desde 1% a 30% para 1991, donde se observó prevalencia más alta en los países del sur de Europa (Grecia, Francia y España) con un 30% mientras que en los países bajos como Holanda y Dinamarca las prevalencias fueron mucho más bajas 6% (Voss,1994) lo que sustenta la tesis de gradiente de norte a sur. Estas variaciones pueden deberse

al tipo de población, política antibiótica seguida en distintos países, tipo de enfermos atendidos y medidas de control tomadas ante nuevos casos de infección en cada institución sanitaria.

Figure 3.23. *Staphylococcus aureus*. Percentage (%) of invasive isolates resistant to meticillin (MRSA), by country, EU/EEA countries, 2013

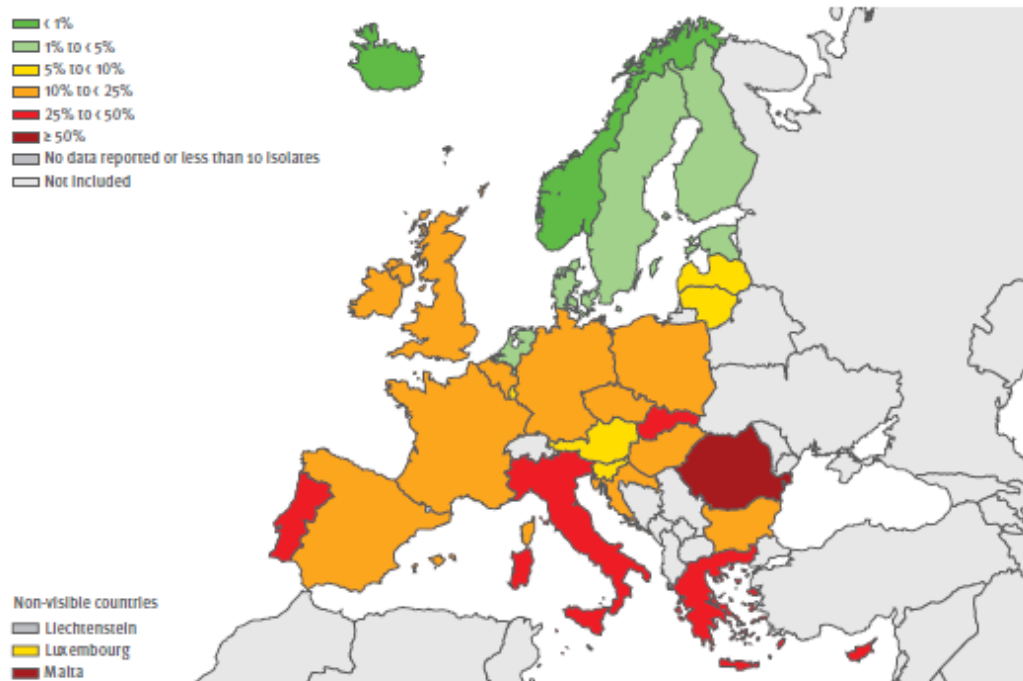


Figura #8 tomado de EARSS 2013. (Report 2013)

En los últimos 10 años se han producido una diseminación del SARM desde los grandes hospitales a otros con menor número de camas y de estos a instituciones de cuidados geriátricos y centros crónicos, donde la epidemia ha sido favorecida por la falta de programas de control de infección en muchos hospitales (Jarvis, 2003).

2.13 EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR SARM EN HOSPITALES

Desde el tiempo en que la meticilina emergió, el MRSA se ha diseminado ampliamente en hospitales, causando una serie variada de infecciones. Las infecciones nosocomiales han representado la carga para ambos, pacientes y sistema de cuidados sanitarios, debido a su asociación con la alta morbilidad y el incremento de costos hospitalarios (Cosgrove et al, 2005). Datos recientes del CDC (centro de Control de enfermedades y prevención demostró que 64% de todas las infecciones de origen nosocomial en estados unidos son causados por *Staphylococcus aureus*. En los estudios de vigilancia nacional de sepsis de origen nosocomial, los investigadores reportaron que el *S. aureus* como el segundo organismo causal de infecciones por sepsis y que la proporción de aislamientos MRSA aumento de 22% en 1995 a 57% en 2001 (Wisplingoff et al, 2004). Las personas infectadas por el SARM tienen una mayor probabilidad de morir en un 64% mayor que las infectadas con cepas no resistentes. Datos del sistema de vigilancia SENTRY también demostraron aumentos de MRSA entre aislados de *S. aureus* de unidades de cuidados intensivos alrededor del mundo (Jones et al, 2004). La resistencia aumenta los costos de atención sanitaria, pues alarga las estancias en los hospitales y se va a requerir más el uso de aislamientos o de cuidados intensivos.

2.14 EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR SARM EN LA COMUNIDAD

Desde mediados de 1990, cepas de MRSA han emergido en la comunidad causando infecciones en pacientes quienes no presentaban factores de riesgo que usualmente se asociaba con cepas hospitalarias, como hospitalizaciones recientes, enfermedades crónicas, diálisis, virus de inmunodeficiencia adquirida y uso de drogas intravenosas (Palavecino,2004). Aunque las cepas adquiridas en la comunidad causan mayormente abscesos y forunculosis, la neumonía severa necrotizante y shock resulta en muertes que han sido asociadas con cepas comunitarias Francis, 2005). Estas nuevas cepas comunitarias son usualmente resistentes a beta lactámicos pero susceptibles a otras clases de antimicrobianos y cargan mayormente el SCC *mec* tipo 1V (V y VII), las cepas

de SARM-CO poseen combinaciones únicas de factores de virulencia incluyendo la LPV y son genéticamente diferentes de las cepas hospitalarias (SARM-H). Los investigadores han sugerido que las cepas SARM-CO han emergido de fondos genéticamente diferentes en lugar de a partir de la difusión mundial de un solo clon. (Okuma et al, 2002).

El SARM-CO es el principal agente etiológico de las infecciones de la piel y partes blandas con especial predominio del clon USA300, que se aísla casi en el 50% de las infecciones cutáneas, en Europa estas infecciones son menos frecuentes, pero su incidencia está aumentando y se observa una mayor variación de cepas circulantes. Su elevada virulencia se debe en gran parte cepas productoras de LPV las cuales se han relacionado con las infecciones piógenas de la piel y partes blandas, así como con la neumonía necrosante. Existe un predominio de estas infecciones en los niños y adultos jóvenes sin factores de riesgo con transmisión intrafamiliar y con recurrencias (Huijsdens et al, 2006).

Un aspecto importante con las cepas SARM-CO es su transmisibilidad. Un 20% de la población está colonizada de forma permanente por *S.aureus* y hasta un 30% de forma intermitente (Gordon et al. 2008). Las fosas nasales anteriores son la zona de colonización más importante. El mecanismo de transmisión más importante es por contacto íntimo ((Archer,1998). La facilidad de transmisión ha favorecido la aparición de brotes de infección en diversos ámbitos. Se han descrito brotes en equipos deportivos, colectivos militares, presos y se han publicado casos de transmisión intrafamiliar así como *compañeros* de escuela.

Actualmente comienzan a aislarse cepas de *S. aureus* con CMI de vancomicina elevada, por lo que se debe hacer énfasis en realizar un adecuado diagnóstico etiológico que comprenda el aislamiento y el estudio de la sensibilidad de estas cepas y un correcto uso de antibióticos. Se debe de mantener la alerta sobre el cambio de sensibilidad antibiótica y la posibilidad de un incremento en la virulencia de *S. aureus* adquirido en la comunidad.

2.15 CONTROL DE INFECCIONES POR SARM

En relación al control la OMS en su informe mundial sobre resistencia a los antibióticos nos instruye sobre la necesidad de instalar sistemas básicos de seguimiento y monitorización o vigilancia. Otras medidas consisten en prevenir infecciones mediante mejor higiene, el lavado de manos es importante, el acceso al agua potable, control de las infecciones en centros sanitarios y la vacunación a fin de disminuir la necesidad del uso de antibióticos.

La descolonización se realiza con mupirocina nasal y lavado de la piel con jabón de clorhexidina durante 5 días. Si la cepa es resistente a la mupirocina, se recomienda la utilización de ácido fusídico tópico al 2% dos veces al día o bacitracina tópica 3 veces al día con clotrimaxol oral durante siete días para evitar recidivas.

Cuando hay diseminación de cepas hay que extremar las medidas de control de la infección. Esto implica que se deba realizar aislamiento de contacto de estos pacientes hasta disponer de dos o más cultivos seriados negativos.

2.16 TRATAMIENTO

El cefadroxilo o la amoxicilina-ácido clavulánico son los fármacos de elección para cubrir *Streptococcus pyogenes* y *S. aureus*. El tratamiento de formas leves o moderadas de infección por SARM-CO consiste en clotrimaxol o clindamicina por vía oral, mientras que en las formas graves se usará la pauta secuencial. En fascitis necrosante se administrará clindamicina o vancomicina por vía intravenosa; en caso de sepsis, afectación pulmonar o multifocal se utilizará vancomicina. Si esta última está contraindicada o se observa fallo terapéutico, se podrá utilizar daptomicina si existe bacteremia asociada o linezolid si hay afectación pulmonar. La clindamicina, linezolid y el ácido fusídico inhiben la producción de LPV y de otros factores de virulencia de las cepas de SARM.

La OMS ha reportado datos sumamente preocupantes en relación a la resistencia de 7 agentes distintos entre los que incluye al *Staphylococcus*

aureus donde nos indica resistencia a antibióticos de último recurso en todas las regiones del mundo. Llama esto a la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos y otros instrumentos que le permitan a los profesionales sanitarios tener ventaja ante la resistencia emergente.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS

Se utilizaron 88 aislados clínicos MRSA positivos recuperados por la red de vigilancia bacteriológica del Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública obtenidos en el año 2007.

3.2 TIPO DE ESTUDIO

El estudio es de tipo epidemiológico descriptivo retrospectivo.

3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión: Todos los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina identificados en los hospitales de la red de vigilancia epidemiológica como SARM referidos al LCRS con información clínica y epidemiológica del caso año 2007.

Criterio exclusión: todos los aislados clínicos diferentes de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina. Aislados de *Staphylococcus aureus* coagulasa negativos. Aislados SARM sin información epidemiológica. Aislados que se contaminen en el proceso. Sólo se tomará una cepa por paciente.

3.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

3.4.1 VALIDACION DE LOS AISLADOS

Se obtuvieron 88 aislamientos crió conservados a -70°C en medio de skim milk por el Laboratorio Central de referencia en salud pública. Se cultivaron dos veces consecutivas en agar tripticasa y soya para comprobar su pureza. Posteriormente se transfirieron a agar sangre para visualizar la beta hemólisis y luego se hicieron pruebas confirmatorias incluyendo el Voges-Proskawer, Manitol, DNAsa y coagulasa para completar la identificación y verificar que se trataba de *Staphylococcus aureus*. El estudio de la sensibilidad de las cepas fue realizado por el Laboratorio Gorgas, los antibióticos utilizados fueron penicilina (10UI), Oxacilina (1 ug), amoxicilina (AMX), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (E), clindamicina (DA), gentamicina (CN), tetraciclina (TE), sulfametoxazol-trimetropim (SXT), cloranfenicol ©, vancomicina (VA) y cefuroxime (FOX)

(según Normas CLSI, 2005). La presencia del gen *mecA* fue determinada por aglutinación por látex PBP2 y fue realizada en el laboratorio Gorgas.

3.4.2 CONSERVACIÓN DE CEPAS

Una vez completada la identificación bioquímica de los aislamientos, se pasaron a un tubo inclinado con tripticasa y soya a 37°C por 24 horas para permitir su crecimiento. Luego fueron cubiertas con glicerol estéril a temperatura ambiente para proceder con la caracterización molecular.

3.4.3 EXTRACCIÓN DEL ADN

Previo a la extracción del DNA genómico las células fueron lisadas según procedimiento descrito por Wichelhaus et al. (1998). Brevemente, se seleccionaron 5 colonias al azar de cultivos frescos de 24 horas de *Staphylococcus aureus* y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mililitros con 180 μ ls de buffer de lisis (20 mM tris-Cl pH 8.0, 2mM EDTA sódico, 1.2% triton X-100, lisozima 20mg/ml), 5.7 μ ls de Lisoestafina (1 μ g/ μ l). Los tubos fueron incubados por lo menos 30 minutos a 37°C. Luego de la lisis procedió con el aislamiento del ADN utilizando DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Brevemente, 25 μ ls de proteinasa K (10mg/ml) y 200 μ l de buffer AL fueron agregados a cada tubo. El contenido fue mezclado con la ayuda de un vortex y luego se procedió con un periodo de incubación de 5 minutos a 37°C. Culminado el período de incubación se agregaron 200 μ ls de etanol 96% grado molecular y se procedió a mezclar con la ayuda de un vortex. Luego la mezcla fue transferida a una mini columna DNeasy (Qiagen) y centrifugada a 6000 g durante 30 segundos. El eluado fue descartado y la columna colocada en un nuevo tubo colector. Se agregaron 500 μ l de buffer AW1, y se procedió a centrifugar a 6000 g por 30 segundos. El eluado fue descartado nuevamente y la columna colocada en un nuevo tubo colector. 500 μ ls de AW2 se adicionaron a la columna, seguido por una centrifugación a 14,000 g por 3 minutos. Luego de descartar el eluado resultante, se procedió a eluir el ADN con 140 μ l de buffer AE y una centrifugación a 6000 g por 1 minuto. El ADN fue colectado en tubos eppendorf

de 1.5 y almacenado a -20°C hasta su uso (protocolo según Saunders y Holmes).

3.4.4 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *mecA*

Se utilizaron por separado dos pares de cebadores *mecA1/mecA2* (Geha et al, 1994) y *mA1/mA2*(cita) para corroboran la presencia del gen *mecA*. La secuencia de cada uno de los iniciadores se presenta en el anexo 2.

La reacción de amplificación se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Wichelhaus et al. (2004). Se utilizó 1 µl de DNA genómico, 5µl de buffer 10X (Promega), 1 µl (10 µM) de cada cebador, 1 ul de templado ADN genómico, 1.25 µl de dNTP's (10 mM), 1 µl de TopTaq DNA polimerasa (Promega, 1 unidad). El volumen final fue de 50 µls. Las condiciones de amplificación fueron 94°C 1 min, 30 ciclos a 94°C 15 segundos, 55°C 15 segundos, 72°C 5 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de la amplificación del ADN fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0.5X TBE conteniendo 1.5 µls de bromuro de Etidio (10 mg/ml). La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 60 minutos. El gel fue cargado con 8 µls de producto amplificado, un control positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC), uno negativo (*E.coli*) y una escalera de peso molecular de 1kb (Promega). La visualización de los productos de amplificación se realizó con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta. Los resultados fueron documentados con la ayuda de una cámara, Ultracam Digital Imaging para su posterior análisis. Estas imágenes fueron guardadas en una carpeta identificada con nombre y fecha ubicada en el laboratorio de Genética y Biología Molecular del edificio de Investigaciones Biológicas.

3.4.5 AMPLIFICACIONES DE LOS GENES *coa* Y *spa*

La amplificación de los genes *coa*, *spa* se realizó con cebadores específicos para cada gen, según protocolo Wichelhaus et al., 2004. La mezcla de reacción consistió en ambos casos de 1 µl de DNA genómico, 5µl de buffer 5X (Promega), 1 µl (10 µM) de cada cebador, 1.25 µl de dNTP's ((10 mM?), 0.5 µl

de TopTaq DNA polimerasa (Promega) (1 unidad). El volumen final de la reacción fue de 50 µl. La reacción de amplificación del DNA se llevó a cabo con un termociclador Perkin Elmer modelo 2400. Las condiciones de amplificación fueron 94°C 1 min, 35 ciclos a 94°C 60 segundos, 56°C 60 segundos, 72°C 3 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de la amplificación del ADN fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0.5X TBE conteniendo 1.5 µls de bromuro de Etidio (10 mg/ml). La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 60 minutos. El gel fue cargado con 8 µls de producto amplificado, un control positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC), uno negativo (E.coli) y una escalera de peso molecular de 1kb (Promega). La visualización de los productos de amplificación se realizó con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta. Los resultados fueron documentados con la ayuda de una cámara, Ultracam Digital Imaging para su posterior análisis. Estas imágenes fueron guardadas en una carpeta identificada con nombre y fecha ubicada en el laboratorio de Genética y Biología Molecular del edificio de Investigaciones Biológicas.

3.4.6 AMPLIFICACIÓN DE GEN *HVR* (REGIÓN HIPERVARIBLE)

La amplificación gen *HVR* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Wichellaus et al (2004), con modificaciones.

La mezcla de reacción consistió en 10 µls de Buffer 5X (Promega) libre de cloruro de magnesio, 1.25 µls dNTPs (10mM), 0.5 µls Top Tap DNA polimerasa (Promega), 1 µl de los cebadores, 3.0 µls de cloruro de magnesio (25mM), 1 µl de DNA genómico. El volumen final de la reacción fue 50 µls. La reacción de amplificación del DNA se llevó a cabo con un termociclador Perkin Elmer modelo 2400. Las condiciones de amplificación fueron 94°C 4 mins; luego 30 ciclos a 94°C 60 s, 55°C 60 s, 72°C 3 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0.5X TBE. Los productos de la amplificación del ADN fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0.5X TBE conteniendo 1.5 µls de

bromuro de Etidio (10 mg/ml). La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 60 minutos. El gel fue cargado con 8 μ ls de producto amplificado, un control positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC), uno negativo (*E.coli*) y una escalera de peso molecular de 1kb (Promega). La visualización de los productos de amplificación se realizó con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta. Los resultados fueron documentados con la ayuda de una cámara, Ultracam Digital Imaging para su posterior análisis. Estas imágenes fueron guardadas en una carpeta identificada con nombre y fecha ubicada en el laboratorio de Genética y Biología Molecular del edificio de Investigaciones Biológicas.

3.4.7 DIGESTIÓN DE LOS AMPLICONES

Se transfirieron a un tubo eppendorf 5 μ ls de cada uno de los amplicones (*coa*, *spa* y *HVR*). A la mezcla se le agregaron 5 μ ls amortiguador 10X NEB 4 (New England Biolabs), 10 unidades de *Hae II* (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania de la reacción fue de 50 μ ls. Luego se procedió con un período de incubación a 37 °C por tres horas. Los productos de la digestión, 0.5 μ ls BSA (100X) fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE conteniendo 1.5 μ ls de bromuro de Etidio (10 mg/ml). La electroforesis se realizó a 120 voltios durante 60 minutos. El gel fue cargado con 8 μ ls de producto amplificado, un control positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC), uno negativo (*E.coli*) y una escalera de peso molecular de 1kb (Promega). La visualización de los productos de amplificación se realizó con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta. Los resultados fueron documentados con la ayuda de una cámara, Ultracam Digital Imaging para su posterior análisis. Estas imágenes fueron guardadas en una carpeta identificada con nombre y fecha ubicada en el laboratorio de Genética y Biología Molecular del edificio de Investigaciones Biológicas.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 RESULTADOS

4.1.1 DETECCIÓN DE *mecA*

La resistencia a meticilina se confirmó mediante la detección del gen *mecA*. La presencia del gen *mecA* se determinó mediante PCR utilizando dos juegos de cebadores diferentes. Los cebadores *mecA1/mecA2* generan un producto de amplificación de 310 pb mientras que los cebadores *mA1/mA2* uno de 280 pb.

Con ambos cebadores se lograron los productos de amplificación esperados en cada uno de los 88 aislamientos. En la figura # se observan los productos de amplificación de 280 y 310 pb. Estos resultados validan la caracterización fenotípica inicial realizada en el ICGES-LCRS.

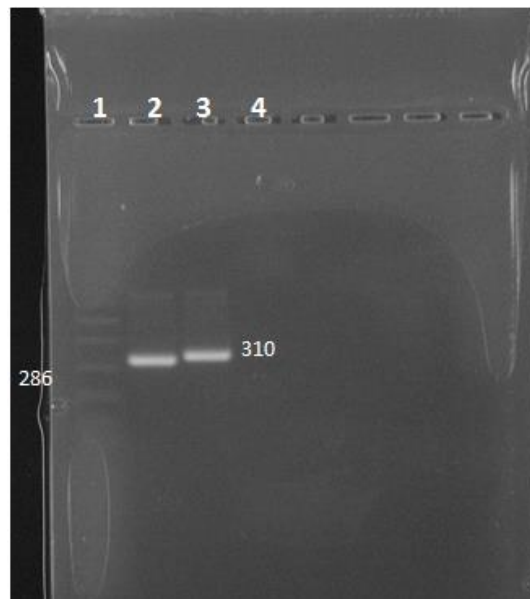


Figura #9 Electroforesis en agarosa al 1% de los amplicones de *mecA*. Carril 1, marcador de peso molecular (100pb. PROMEGA). Carril 2, banda de 280 bp. obtenida con *mA1/mA2*. Carril 3, banda de 310 pb generada con *mecA1/mecA2*. Carril 4, control negativo.

4.1.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *coa*.

La amplificación de la región de ADN comprendida entre los cebadores *coa1/coa2* permitió la detección de un fragmento en todas las muestras de tamaño comprendido entre 600 a 1000 pb. Los productos generados con este cebador fueron de 600 bp, 700pb, 750 bp, 800 bp, 850 bp , 900 bp y 1000 bp. En la figura N° .Se observa el polimorfismo del gen *coa* en las muestras analizadas. Se obtuvieron productos de amplificación para este gen en el 91% de los aislamientos (80/88). En el 6.8% (6/88) no se lograron obtener productos de amplificación mientras que él 2.27% (2/88) generó dos bandas . Los aislamientos con bandas dobles fueron el aislamiento N° 11 productos de 700 y 800 bp y el aislado N°12 productos de 700 bp y 900bp. En la mayoría de los aislamientos (%) se obtuvo un producto de amplificación para el gen *coa* de 600 pb. (ver figura #10)

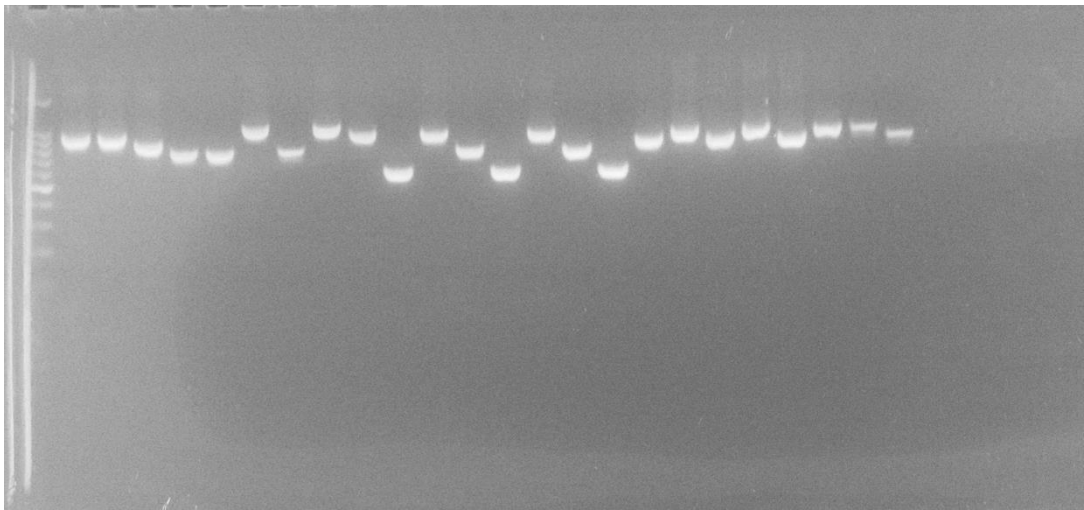


Figura #10 Polimorfismo en el gen *coa*. Se observan bandas desde 600bp a 1000bp.

4.1.3 AMPLIFICACION GEN *spa*.

Se logró la amplificación de una región del gen *spa* en 57 de los 88 aislamientos (64.8%). 56/88 (63.6%) de los aislamientos produjeron una banda de 1500 bp. y 1/88 (1.13%) bandas de 1000 y 1200 bp. (figura #11 25/88 aislamientos no produjeron bandas de amplificación).

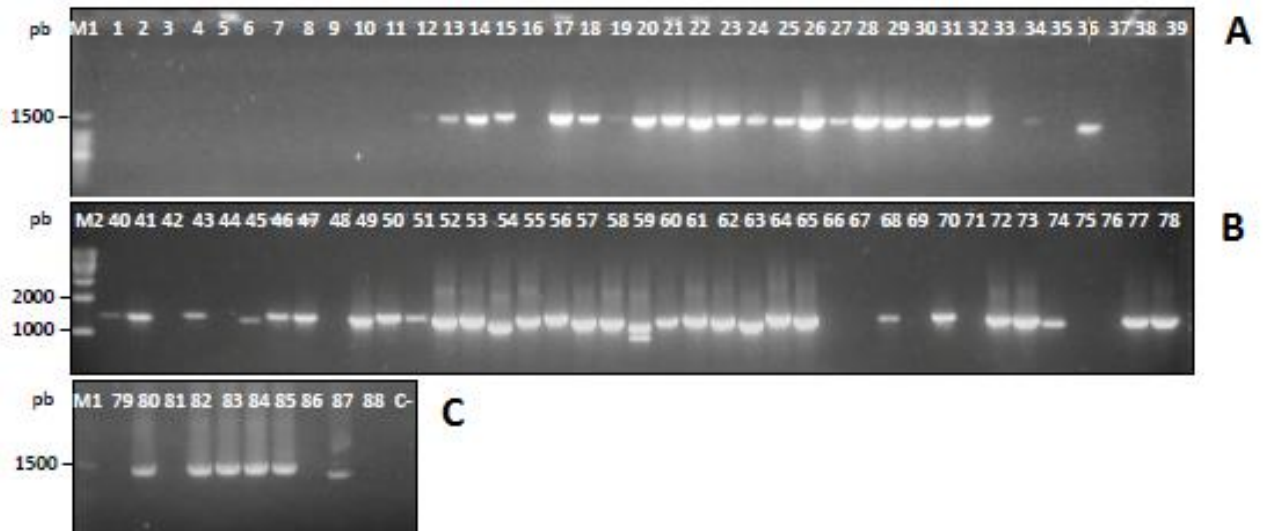


Figura #11. Productos de amplificación del gen *spa*. A. Aislamientos 1-39. B. Aislamientos 40-78. C. 79-88. Se observa en la mayoría de los aislamientos una banda única de aproximadamente 1500 bp con excepción del aislamiento 59 en el cual se observa además de la banda de 1500 bp otra banda de aproximadamente 1400 pb.

4.1.4 AMPLIFICACION GEN HVR.

La amplificación de la región hipervariable del gen *mecA* se logró en sólo 33 de los 88 aislamientos (37.5%). El producto de amplificación para esta región en 11 de los 33 aislamientos fue de 550 bp y en los 22 restantes de 600 pb. Los los productos de amplificación de la región hipervariable del gen *mecA* se presentan en la figura #12.

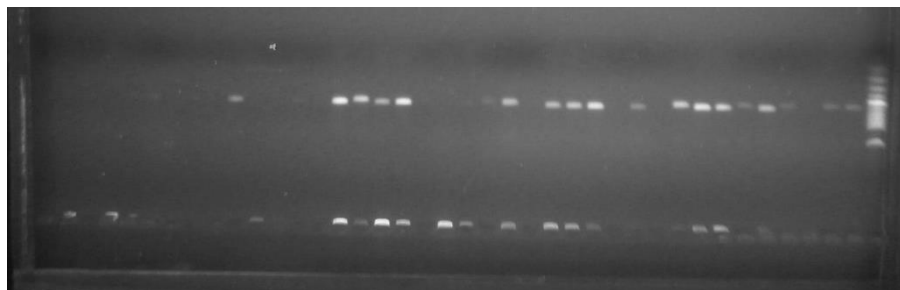


Figura #12 gel de agarosa 1% muestra amplificación del las muestras gen HVR

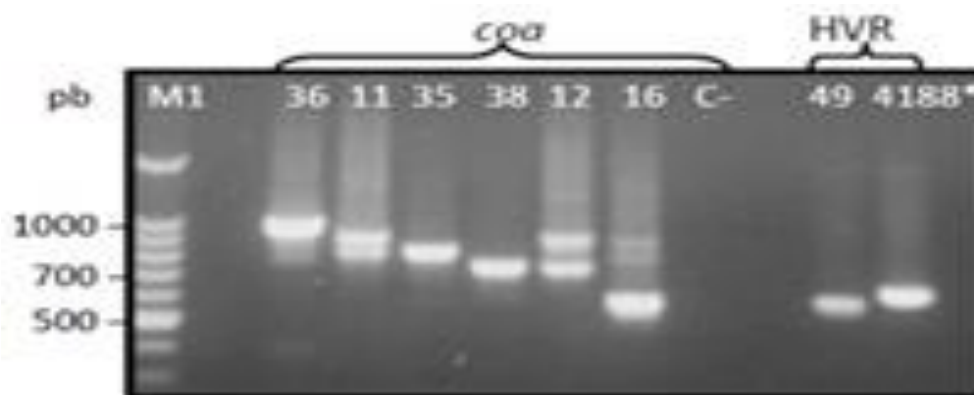


Figura #13. Electroforesis en gel de agarosa mostrando polimorfismo en gen coa y en gen HVR.

Tabla N°2 Consolidado de resultados

GEN O REGIÓN AMPLIFICADA	MUESTRAS AMPLIFICADAS	OBSERVACIÓN DE BANDAS	
		POSITIVAS	NEGATIVAS
coa	88	82	6
HVR	88	33	55
spa	88	68	20

4.1.5 RFLP DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE *coa*, *spa* y *HVR*.

El polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) se realizó en 84 aislamientos ya que 4 fueron excluidos debido a que no se obtuvo productos de amplificación para ninguno de los tres genes.

Las comparaciones de los patrones de restricción fueron realizadas entre aislamientos en los que se logró la amplificación de los mismos genes. Se establecieron con base en este criterio cuatro grupos de comparación. El primer grupo compuesto por los aislamientos en los cuales amplificaron *coa*, *spa* y *HVR*. El segundo grupo, aislamientos en los cuales amplificaron *coa* y *spa*. El tercer grupo, aislamientos con amplificación en *coa* y *HVR* y el último grupo aislamientos en los cuales sólo amplificó uno de los tres genes. En este último grupo se compararon los patrones de restricción entre aislamientos con amplificaciones para el mismo gen.

La digestión de la mezcla de los productos de PCR de los tres genes (*coa*, *spa* *HVR*) generaron 10 bandas polimórficas. Los tamaños de las bandas fueron de 900, 750, 700, 650, 600, 500, 450, 400 y 240 pares de bases (pb).

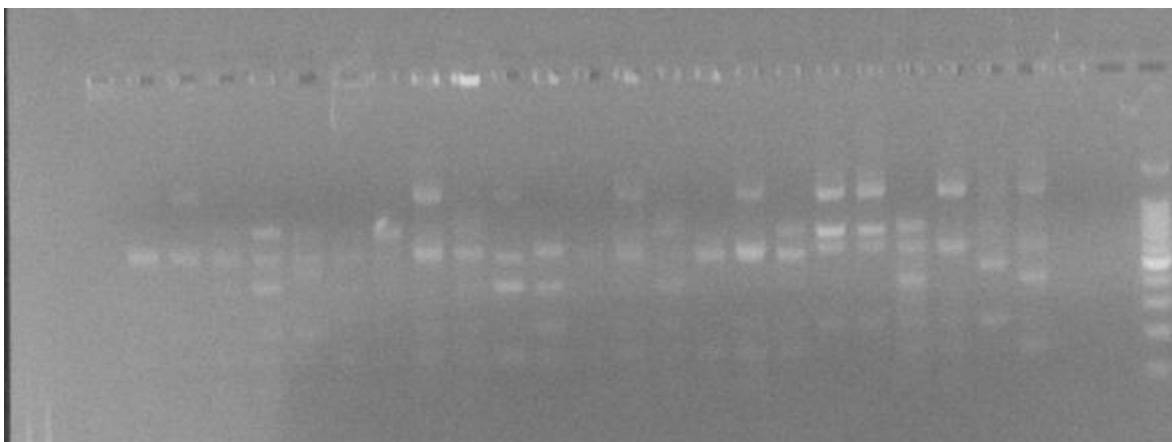
En el primer grupo de aislamientos se observaron 11 patrones de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs). Los RFLPs se observan en la **figura ¿?**. Las bandas presentes en cada uno de estos aislamientos se presentan en la tabla #. Los aislamientos 17, 18, 19, 21,22,23, 25, 30, 32, 34, 52, 55, 56, 57, 60 y 62 presentaron patrones de restricción únicos. Los aislamientos 13, 14 y 15; 24 y 27 y 30; 49 y 50 presentaron los mismos patrones.

TABLA Nª 3 grupo 1. Tres genes amplificaron (*coa*, *spa*, *HVR*).

	246	400	450	500	600	650	700	750	800	900
13	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
14	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
15	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
17	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
18	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
19	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
21	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
22	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
23	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
24	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
25	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
27	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
30	1	1	0		1	0	0	0	0	0
32	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
34	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
49	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
50	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
52	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
55	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
56	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
57	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
60	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
62	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0

El análisis conjunto de los genes (*coa*, *spa* y *HVR*) diferenció 11 patrones polimórficos de restricción, lo que demuestra una gran diversidad intraespecífica.

ponerle a esta tabla Numeros con paint



La tabla n° 4 nos muestra los productos de digestión y tamaño de los fragmentos que se generaron de la digestión simultánea de *coa*, *spa* y *HVR*. La figura #14 muestra los patrones de digestión de muchos de estos aislados.

TABLA N°4. dos genes (coa y spa)

AISLAMIENTO	246	400	450	500	600	700	750	800
20	1	1	0	1	1	0	1	0
28	1	1	0	1	1	0	0	0
31	1	1	0	1	1	0	0	0
36	1	1	1	1	1	0	0	0
40	1	0	0	1	0	0	0	0
41	1	1	0	1	0	0	0	0
43	1	0	0	0	1	1	0	0
45	1	0	0	0	1	0	0	0
47	1	1	0	1	0	1	0	0
51	1	1	0	1	0	1	0	0
53	1	0	1	0	0	1	1	0
58	1	0	0	0	1	0	0	1
59	0	0	0	1	1	0	0	1
61	1	0	0	0	1	0	0	1
63	1	1	0	0	1	0	0	0
64	1	1	0	1	0	1	0	0
65	1	1	0	1	0	1	0	0
68	1	0	0	1	0	0	0	1
70	1	1	0	0	1	1	0	0
72	0	1	0	1	1	1	0	0
74	1	0	1	1	0	0	0	0
77	1	1	0	0	1	0	0	0
78	1	1	0	1	1	1	0	0
80	1	1	0	1	0	0	0	0
82	1	1	0	1	0	0	0	1

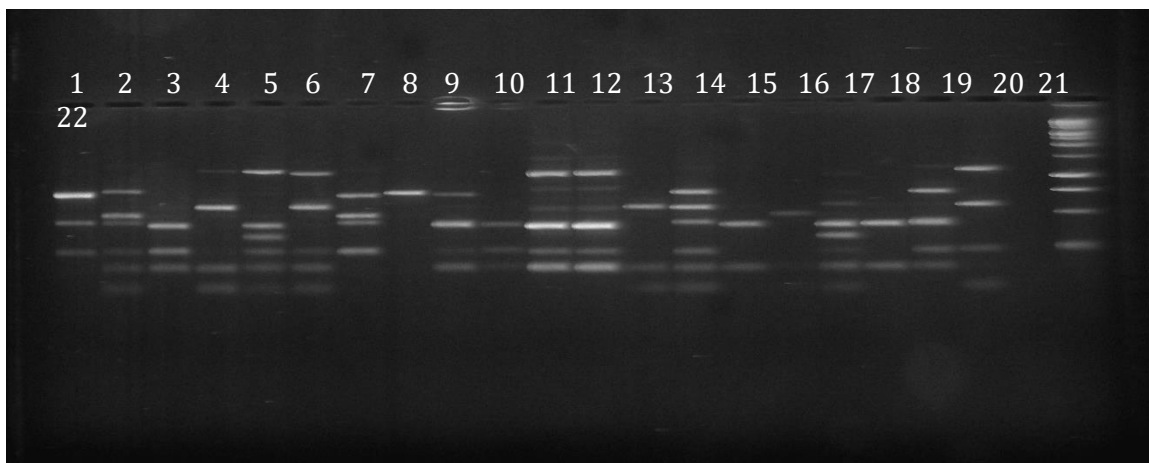


Figura #15 Electroforesis en gel de agarosa 2% donde muestra los tamaños de bandas que se generaron después de la digestión simultanea de los genes *coa* y *spa* y/o *coa* y *HVR*.

En la tabla N° 5 se muestran agrupamos los tamaños de bandas que se generan después de la digestión simultánea de los genes *coa* y *HVR*. La figura muestra los patrones de digestión de algunos de estos aislamientos.

TABLA N°5. de dos genes (*coa* *HVR*)

AISLAMIENTO	246	400	450	500	600	750
1	0	1	0	1	1	0
2	1	0	1	1	1	0
4	1	0	1	0	0	0
6	1	0	1	1	1	0
7	0	1	0	1	1	0
8	1	1	0	1	1	0
9	1	1	0	1	1	0
11	1	1	0	1	1	1
12	1	1	0	1	1	0
33	1	1	0	1	1	0

En la tabla N° 6 se muestran las bandas y los tamaños obtenidos luego de la restricción de *coa* con *HaeII* en los aislamientos donde sólo amplificó este gen. Se observan en estos aislamientos 11 patrones de restricción diferentes.

TABLA N° 6 (aislamientos en las que solo amplificó *coa*)

AISLAMIENTO	246	400	450	500	600	650	700	800
35	1	1	0	1	0	0	0	0
37	1	0	0	1	1	0	0	0
38	1	0	1	0	0	0	0	0
39	1	0	1	1	0	0	0	0
42	1	1	0	1	0	0	0	0
44	1	0	0	0	0	1	0	0
66		1	0	1	0	0	0	1
67	1	1	0	1	0	0	0	1
69	1	1	0	1	0	1	0	0
71	1	1	0	0	0	0	1	0
76	1	1	0	0	1	0	0	0

TABLA N° 7 Solo un patrón de restricción amplificó (HVR)

AISLAMIENTO	400 pb.
5	1

4.2 DISCUSIÓN.

El aumento de cepas de origen hospitalario como de origen comunitario de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina está cambiando la forma de su manejo. Se requiere de una más rápida, confiable caracterización de los aislados para tomar decisiones importantes en cuanto a la implementación de medidas de control y tratamiento adecuado.

Debido a esto caracterizaciones moleculares con todo tipo de técnicas están al auge, ellas nos permiten establecer cuando un aislado recuperado de diferentes pacientes y/o fuentes representan una cepa o múltiples cepas diferentes.

El antibiograma ha sido desde ya hace mucho la herramienta principal para determinar muchos brotes hospitalarios. Es una técnica estandarizada y ampliamente disponible que puede ser utilizada con todas las especies microbianas. Su desventaja consiste en la variabilidad de la expresión a la resistencia, que es también susceptible a inestabilidad por transmisión horizontal y a la pérdida de elementos genéticos extracromosomales. (Montesinos et al, 2002).

El RFLP es un método molecular de tipificación muy utilizado en bacterias como el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, muchas investigaciones lo han utilizado y hasta ha sido comparado por muchos investigadores con el PFGE que es el estándar de oro. En este estudio se utilizó la metodología RFLP-PCR lográndose por primera vez en nuestro país estandarizar una metódica de PCR para la detección simultánea de los genes *mecA*, *coa*, *spa* y *HVR* obteniendo patrones de restricción reproducibles y no ambiguos para todos los aislados examinados.

En el caso del gen *mecA* el PCR constituye el estándar de oro, en este estudio se pudo confirmar su presencia usando dos pares diferentes de

cebadores, *mecA1/mecA2* que generaron un producto de amplificación 310pb totalmente compatible con la literatura según de investigadores como Mahmoudi et al 2016 y segundo par de cebadores *mA1/mA2* que produce un producto de amplificación a 280 pb igualmente compatible según datos aportados por investigadores y escritores como Teruyo et al. En el 100% de los aislados amplificaron demostrando que los pares de cebadores diseñados por Gohe et al. anidan en una región altamente conservada en el gen *mecA*. Estos resultados logran validar la identificación fenotípica efectuada mediante antibiogramas, metodología látex prueba de escrutinio para PBP2a realizada en el ICGES-LCRS metodología con que se establece resistencia a meticilina en nuestro sistema de vigilancia. (Brown et al, 2005).

El gen *coa* fue el que dentro del estudio tuvo mayor porcentaje de amplificación 80/88 (91%) de los aislamientos mostraron banda de amplificación por ello es el gen *coa* un marcador simple y eficiente para tipificar *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Se nos hizo evidente los diferentes productos de amplificación, siete en total, mostraron tamaños de bandas que van desde 600pb a 1000bp indicando a simple vista diferencias entre nuestros aislamientos.

La mayoría de los patrones de *coa* correspondían a 600pb (47.7 %) seguido por el patrón de 800pb (26.1%). En investigaciones como las lideradas por Hookey et al 1998, Parviz et al 2016 difieren con nuestros hallazgos ya que ellos encontraron que el patrón de *coa* más común es el de 800pb. Investigaciones dirigidas por Ishino et al. mostraron rangos de tamaño de bandas luego de la amplificación desde 650pb a 1000pb haciendo un leve contraste con nuestros resultados donde encontramos tamaños de bandas desde 600 pb a 1000pb.

La presencia de dobles bandas, reportado por Shakeri et al como un resultado inusual, reportamos en dos de los aislados este hallazgo lo nos conduce a inferir que existe entre nuestros aislados más de una forma alélica

del gen coagulasa, dejando la posibilidad de que estas cepas puedan producir más de estas variantes. Es probable inferir que el cebador anidó en dos lados generando una doble banda. Al respecto no he encontrado cita que documente este aspecto en otras investigaciones.

El gran polimorfismo demostrado del gen *coa* es debido a diversidad en la secuencia aminoácida y el número de tandems repetitivos en la región 3' terminal, la cual puede ser causada por deleciones, inserciones y mutaciones en la porción 3' terminal del gen *coa* donde muchos nucleótidos son insertados y como consecuencia se producen cambios en el tamaño del gen *coa*. (Zamani et al, 2007). Las diferencias en los tipos de coagulasa están sujetas a variaciones geográficas (23)cita. Ver investigaciones donde hagan dif según area geográfica???

Seguido a la exposición del gen *coa* a la enzima de restricción *Hae II* se producen 9 patrones de restricción diferentes, con bandas desde 246pb a 800pb. Por lo que podemos concluir que la tipificación del gen *coa* nos produjo siete patrones de *coa* por tipificación de PCR y 11 luego de la exposición a enzima de restricción *Hae II*.

En cuanto al gen *spa*, este no se encuentra consistentemente expresado en todos los aislados de los *Staphylococcus aureus*, los datos de la investigación reflejan que 25/88 de los aislamientos(28.4%) no presentaron banda de amplificación con el gen *spa* (Shakeri et al, 2010), este estudio africano nos reportan una prevalencia de 5% de *Staphylococcus aureus* sin expresión de proteína A (Adesida et al,2006).

Se encontró un aislamiento que generó banda doble entre 1400pb y 1200pb, lo cual es compatible con la investigación de Shakeri et al, este grupo investigador reportó una banda doble idéntica a la aquí reportada y manifiestan no haber encontrado ningún documento en la literatura que haya trabajado con PCR y el gen *spa* que la haya reportado, siendo esta la segunda investigación que reporta cepas de *Staphylococcus aureus* con banda doble (Shakeri et al, 2010). La frecuencia de este fenómeno banda doble se dio en la investigación

de Shakeri et al es del 10.6%, en nuestro caso el porcentaje se redujo a 1.13% pero esto puede ser debido a la cantidad de muestras que manejamos en el estudio sólo 88 aislados contra los de ellos que fueron de 1459 aislados.

Tanto Shakeri et al como Adesida et al. reportan amplificaciones negativas las cuales son considerados como un tipo separado según estos grupos de investigadores.

La mayoría de los aislamientos logró banda de amplificación única (63.6%) produciendo banda a 1500pb, 1.13 % de los aislados produjeron banda única entre 1000 a 1200pb. Sin embargo; Farria et al y Stommenger et al demostraron igual porcentaje 99% de los aislamientos de los *Staphylococcus aureus* pueden ser tipificado por medio de la proteína A, nosotros encontramos que solo 63.6% de nuestros aislados produjeron amplificación con gen *spa*. Cabe destacar que los amplicones de *spa* generaron bandas de tamaño muy cercano al esperado (1500 pb). El longitud en el tamaño de la proteína A es de importancia epidemiológica ya que proteína A muy cortas no pueden adherirse a la superficie nasal de las células epiteliales y pueden ser eliminadas por respiración, estornudos y hasta por medio de la tos (Fenner et al, 2008).

El polimorfismo de gen *spa* se explica por por la presencia de la región X la cual está localizada en la porción 3' terminal y consiste de una longitud de 24 nucleótidos. La diversidad en la región X es la que causa variación en diferentes proteína A *Staphylococcus aureus* por lo que podemos inferir que en nuestras cepas existe poca diversidad en esta región ya que solo la mayoría de nuestros patrones presentaban banda a 1500pb.

La restricción de la proteína A genera tres tipos de bandas 246pb, 400pb, 738pb. La codificación genética de estas dos proteínas, coagulasa (*coa*) y Proteína A *Staphylococcus aureus* (*spa*) han sido los marcadores más ampliamente utilizados como tipificador molecular debido a que ellos contienen unidades polimórficas altamente repetitivas (Frenay et al, 1996) (Van Belkum et al, 1993). Entre ambos gen *coa* y *spa* produjeron 17 patrones distintos de restricción, lo que los hace nos indica que la técnica RFLP en el caso de estos

marcadores es una técnica útil, tipificable, reproducible y con gran poder discriminatorio. (Afrough, 2012).

La región hipervariable (*HVR*) adyacente al *mecA* que utilizamos en la investigación fue la más demandante para ser incluida en el estudio, debido a que realizando amplificaciones en grupo no logramos obtener bandas específicas ya que detectábamos muchas bandas inespecíficas. Para trabajar estas bandas inespecíficas debimos trabajar con concentraciones diferentes de cloruro de magnesio (1.0, 1.3 y 1.5) mM y temperaturas diferentes de anidación de 55°C, 56°C y 56°C, escogiéndose 1.3 mM cloruro de magnesio y 55°C, esto solo para hacer la amplificación del gen *HVR*.

Logramos que solo 33/88 muestras amplificaran para *HVR* para ser nuestro porcentaje de recuperación más bajo de la investigación. Sólo dos patrones de bandas diferentes para los amplificados *HVR* por PCR que se generaron a 550pb (11/33) y 600pb (22/33). Luego de la restricción con *HaeIII* *HVR* genera una banda de 400pb.

Para las investigaciones de tipo epidemiológicas requerimos marcadores genéticos capaces de tipificar la gran totalidad de las cepas analizadas. *HVR* no reunió tales características, pero si nos permitió comparar nuestros resultados con los recogidos en la literatura. La falla en los resultados positivos con la diana escogida podría deberse a variaciones en la secuencia de los sitios de reconocimiento de los cebadores.

En estudios consultado investigadores refieren una recuperación de positivos de 99.8% con respecto al gen *HVR* pero en esta metodología este grupo investigativo utilizó tres cebadores *HVR1*, *HVR2* y *HVR3* para anidar en las regiones del gen por lo que pensamos ello les ayudó a obtener estos resultados alentadores. Proponemos para próximas investigaciones en las que se utilice la región hipervariable del gen *mecA* hacer uso de tres cebadores y comprobar realmente el porcentaje de resultados positivos.

Por primera vez en nuestro país se logró estandarizar una metodología de PCR para la detección simultánea de genes *mecA*, *HVR*, *coa* y *spa*,

observándose que algunos métodos no dieron los resultados esperados pero los reportamos responsablemente porque quizás mediante reportando estos pequeños fracasos investigativos podremos ayudar a futuros microbiólogos en nuestro país a tomar las medidas preventivas necesaria al utilizar un par o triplete de cebadores, más que un fracaso considero son pequeñas victorias a futuro.

Además con la obtención también de bandas intensa, fuertes en todos los genes podemos establecer que nuestra metodología escogida para la extracción del ADN genómico fue exitoso. Nuestra técnica utiliza un método de extracción sencillo y práctico utilizando enzimas líticas y puede ser realizado en un tiempo corto.

Con relación de la restricción de los amplicones *spa*, *coa* y *HVR* por cepa, recolectamos bandas esperadas, entre 2 y 7 bandas según el caso lo que hace relativamente fácil su interpretación. Para esta técnica la diferencia en una banda significa que es una cepa diferente. Validamos la observación entre tres y siete bandas luego de la digestión lo que permite su fácil identificación, todo esto compatible con nuestra investigación, por lo que aun con grandes obstáculos tecnológicos pudimos supera esta brecha y exponer nuestra investigación y compararlas con otros estudios.

El estudio demuestra que el análisis combinado de genes polimórficos utilizando PCR-RFLP es altamente discriminatorio para MRSA, por lo que nuestra conclusión sería que el PCR-RFLP es una herramienta molecular sencilla, rápida, económica y confiable para realizar vigilancia epidemiológica de rutina que nos ayudará a un mejorar la vigilancia, control y tratamiento de infecciones logrando de esta manera evitar en lo posible el incremento de cepas resistentes para los cuales ya no hay medicación disponible.

4.3 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Podemos concluir que la tipificación del gen *coa* nos produjo siete patrones de *coa* por tipificación de PCR y 11 luego de la exposición a enzima de restricción *Hae II*.

25/88 cepas no presentaron amplificación gen *spa*.

1.13% de los aislados presentó una doble banda entre 1200 y 1400pb, segunda en estudios realizados ya que Shakeri et al reportaron la primera indicándonos que en literatura consultada no encontraron ningún otro equipo de investigación que la hayan documentado. (Secuenciación de este perfil). Solo reportamos 1/88 (1.13%) pero la cantidad de muestra era muy inferior a la de ellos 88 aislados contra 1456 aislados.

La mayoría de los aislamientos 57/88 (63.6%) produjo banda de amplificación de 1500pb esto es en cuanto al gen *spa*.

De la combinación en patrones de restricción de gen *coa* y *spa* logramos determinar 17 patrones de restricción diferentes.

La limitación de la técnica se da con aquellos aislados donde no se obtienen amplificación de *HVR*.

Tal vez el uso de tres cebadores en vez de dos para la región *HVR* del gen *meca* ayude al logro de mayor número de amplificaciones.

El número de bandas luego de la digestión con *HaeII* varia desde tres a siete lo que permite una interpretación sencilla de los patrones de restricción.

4.4 BIBLIOGRAFIA

Archer, GL. (1991). *Staphylococcus aureus: A well-armed pathogen.*

Archer, GL. (2005) *Staphylococcus epidermis and other coagulase-negative Staphylococci. Principles and practices of infectious disease*

Bannerman TL. (Ed. 8). (2003). *Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. Manual of clinical Microbiology.* ASM PRESS

España. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2003). *Infección por Staphylococcus aureus resistente a meticilina*

Chavez-Bueno, S., Bozdogan, B., Katz, K., Bowlware, N., Cavuoti, D., Ahmad, G. McCracken Jr., Appelbaum, P. (2005). *Inducible Clindamycin resistance and molecular epidemiologic trends of Pediatric community – Acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Dallas Texas. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36 (2): 2283-2288.*

Cuevas, O., Cercenado, E., Vindel, A., Gúnea, J., Sánchez-Conde, M., Sánchez-Somolinos, M., and Bouza, E. (2004). *Evolution of the antimicrobial resistance of Staphylococcus spp. in Spain: five nationwide prevalence studies. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48 4240-4245.*

Cuevas, O., Cercenado E, Goyanes MJet al y grupo Español para el estudio de estafilococos. (2008). *Staphylococcus spp.: En España situación actual y evolución de la resistencia a los antimicrobianos [versión electrónica]. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, Vol 26: 269-272*

Cosgrove, S.E., Qi, Y., Kaye, K. S., Harbarth, S., Karchmer, A.W., y Carmeli, Y. (2005). *The impact of methicillin resistance in Staphylococcus aureus bacteremia on patient outcomes: Mortality, length of stay, and hospital charges. Infection Control & Hospital Epidemiology, 26, 166-174*

Crisostomo, M.I., Westh, H., Tomasz, A., Chung, M., Oliveira, D.C., Lencastre, H. (2001) The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. [versión electrónica]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, Vol: 98 9865-9870

Denis, O., Deplano, A., Nonhoff, C., De Rik, R., Mendonca, R., Rottiers, S., Vanhoof, R., Struelens, M. (2004). Nacional Surveillance of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian hospitals indicates rapid diversification of epidemic clones. *Antimicrobial Agents and Chemoteraphy*, p 48 (9): 3625-3629.

Enright MC, Robinson DA, Randle G et al. (2002). The Evolutionary history of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [versión electrónica]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, Vol 99: 7687-7692.

Fey, P., Said-Salim, B., Rupp, M:E., Hinrich, H., Boxrud, J., Davis, B., Kreiswirth, B.N, Schilievvert, M. (2003). Comparative molecular analysis of community or hospital acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p47 (1): 196-203.

Fluckiger, U.,Widmer, F., (2003). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Can PCR replace pulsed- field gel electrophoresis?. *Journal of Clinical Microbiology*, p 41 (7): 3131-3186.

Gil. M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina [versión electrónica]. *Revista Chilena de Infectología*, Vol: 17 (2): 145-152.

Gonzalez. I., A., Gonzalez. L., Travieso. F. (2006). Resistencia a las penicilinas en la Habana, Cuba y su incidencia en el genero *Staphylococcus*. Frecuencia de aparición de estafilococos resistentes a meticilina [revista electrónica]. *Revista Cubana de Microbiología*.

M. Guzman-Blanco, C. Mejia, R. Isturiz, C. Alvarez, L. Bavestrello, E. Gotuzzo. (2009). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in

Latin America Int. *Journal Antimicrobial Agents* [versión electrónica]. Medline, Vol 34, pp 304-308.

Hookey, J., Richarson, J., Cookson, B. (1998). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase Gene [versión electrónica]. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 36 (4): p1083-1089.

Jordan. R., Ortiz. T. *Staphylococcus aureus*: Espectro de resistencia emergente frente a nuevos antimicrobianos. Panamá. Tesis para optar por el título de Tecnología Médica.

K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T. (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* [version electronica] *Trends. Microbiology*, Vol 9 : p486-493.

Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., Wanatabe, S. (1991). Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by Polymerase Chain Reaction [version electronica]. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 29 (10): p2240-2244.

Olivera, D.C., Lencastre, H. (2002). Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.46.

Pahissa A. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* [versión electronica]. *ICG Marge, SL*, Ed 1. U.S.A.

Palavecino, E. (2004). Clinical, Epidemiological and Laboratory Aspects of Methicillin –Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols [version electronica]. *Humana Press Inc*, Chapter #1. (2007)

Petersdorf, S., Oberdorfer, K., Wendt, C. (2006). Longitudinal Study of the molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a University Hospital [version electronica]. *Journal Clinical Microbiology*, Vol 44(12): p4297-4302.

Report, S., (2013). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. (Informe N°). *SURVEILLANCE REPORT*.

Robinson. A., Enright. M., (2003). Evolutionary models of the emergente of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, p47(12): 3926-3934.

Rojas. N, Fernández, N, Espino. M, Fernández. M. (2001). Patrones de droga resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico humano. *Revistas Cubana de Medicina Tropical*, Vol53(1): p1-8.

Rubin, R., Harrington, A., Dietrich, K., Greene, J., Moiduddin, A. (1999). The Economic impact of *Staphylococcus aureus* in New York City. (Informe N° 5(1): p1110-1123). *Emerging Infectious Diseases*. CC: Gobierno de los EE.UU.

Scheleifer KB.(1986). *Gram positive cocci*. Bergey's Manual of systematic bacteriology, Vol 2, Baltimore: U.S.A.

Shopsin, B., Kreiswirth, B. (2004). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*.

Song. J., Hiramatsu. K. Suh, J, Ko. K, and the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study group. (2004). Emergente in Asian Countries of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, p48(12): p4926-4928.

Vega, S., Caballero, E , Comunicación Personal. (2006)

Whichelhau, T.A., Hunfeld P., Boddington, B., Kraiczysz, P., Schafer, V., Brade, V. (2001). Rapid molecular typing of methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus by PCR-RFLP. *Infection & Control Hospital Epidemiology*, p22: 294-298.
- Yinduo, J. (2007). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) [version electronica]. Protocols. *Humana Press*.
- Van Der Zee, A., Verbakel, H., Van Zon, J., Frenay, I., Van Belkum, A., Peeters, A., Buiting, A., Bergmans, A. 1999. Molecular Genotyping of Staphylococcus aureus strains: Comparison of Repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker [version electronica]. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 37(2):342-349.
- EE.UU. Clinical and Laboratory standard institute/NCCLS.(2005). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
- Fifteenth International Supplement. *Clinical and Laboratory Standart Institute/NCCLS*, document M100-S15. CLSI, Wayne, PA.
- Robinson, D. A, and Enright, M.C. (2003) Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistance Staphylococcus aureus [version electronica]. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy*, Vol47: p3926-3934.
- Oliveira, D.C., Tomasz, A., De Lencastre, H., (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus [version electronica]. *The Lancet Infectious Diseases*, Vol 2: p180-189.

4.5 ANEXOS

Anexos #1

Secuencia del gen *mecA* en *Staphylococcus aureus* indicando con los colores rojo y azul, el sitio de anidamiento de los iniciadores utilizados en la investigación.

mecA

GTCGGGTTTGGTATATATTTTTATGCTTCCAAGATAAAGAAATTAATAAT
ACTATTGATGCAATTGAAG

**ATAAAAATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGC
GATAATGGTGAAGTAGAAAT**

**GACTGAACGTCCGATAAAAATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATA
AACATTCAGGATCGTAAAATA**

**AAAAAAGTATCTAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTA
AAACAACTACGGTAACATTG**

**ATCGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTA
GATTGGGATCATAGCGTCAT**

TATTCCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATC
AGAACGTGGTAAAATTTTA

**GACCGAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAG
GCATCGTTCCAAGAATGTAT**

CTAAAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACT
ATATCAAACAACAAATGGA

TCAAATTTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAA
AATGGATGAATATTTAAGT

GATTTGCAAAAAAATTTTCATCTTACAATAATGAAACAGAAAGTCGTAAC
TATCCTCTAGAAAAAGCGA

CTTCACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTA ACTCTGAAGAATTAAAAC
AAAAAGAATATAAAGGCTA

TAAAGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAACTTTACGATA
AAAAGCTCCAACATGAAGAT

GGCTATCGTGT CACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATAC
ATTAATAGAGAAAAAGAAAA

AAGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAGAGTA
TTTATAACAACATGAAAAA

**TGATTATGGCTCAGGTA CTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTA
GCACTTGTAAGCACACCTTCA**

**TATGACGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATA
AATTAACCGAAGATAAAAAAG**

**AACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACA ACTTCACCAGGTTCAACTCA
AAAAATATTAACAGCAATGAT**

**TGGGTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAACAAGTTATAAAATCGAT
GGTAAAGGTTGGCAAAAAGAT**

**AAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAA
TATCGACTTAAAACAAGCAA**

TAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCA
GTAAGAAATTTGAAAAAGG

CATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTA
TAATGCTCAAATTTCAAAC

AAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGT
GAAATACTGATTAACCCAG

TACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACG
CACCTCACTTATTA AAAAGA

CACGAAAAACAAAGTTTGGAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAATATCAA
TCTATTAAGTATGATGGTATG

CAACAAGTCGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCA
AACTTAATTGGCAAATCCG

GTACTGCAGAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATTGG
GTGGTTTATATCATATGATAA

AGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAA
AGGAATGGCTAGCTACAAT

GCCAAAATCTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAA
AAAA

ROJO= SITIO DE ANIDAMIENTO DE MecA-1 y MecA-2
310 bp

Amplicon =

AZUL = SITIO DE ANIDAMIENTO DE mA1 y mA2
286 bp

Amplicón =

Nota: Datos obtenidos del Gene Bank.

Anexo #2Iniciadores gen *mecA*

Iniciador	Secuencia	Posición en <i>mecA</i>	Tamaño amplificado
<i>mecA</i> -1	5'GTAGAAATGACTGAACGTCCGAT AA3'	318-342	310pb
<i>mecA</i> -2	5'CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTA A 3'	603-627	310pb
<i>mA1</i>	5'TGCTATCCACCCTCAAACAGG 3'		280pb
<i>mA2</i>	5' AACGTTGTAACCACCCCAAGA 3'		280pb

Anexo #3

Plantilla para la preparación de la solución de trabajo (master mix) para amplificar el gen *mecA* y *mA* utilizando iniciadores *mA1/mA2* y *mecA1/ mecA2* la misma plantilla nos indica las condiciones de amplificación a utilizar.

Gen: _____ Fecha: _____

Reactivos	Para 1 muestra	Para _____x muestras
Buffer 10X	5µl	
Primer 1	1µl	
Primer 2	1µl	
Templado	1µl	
DNTPs	1.25µl	
Taq DNAPolimerasa	1µl	
Agua grado molecular	39.75µl	
Volumen total	50 µl	
Condiciones de la amplificación 94°C/1min, 30 ciclos 94°C/15seg, 55°C/15 seg, 72°C/5 seg, extensión final 72°C/10 minutos		

Anexo #4

Preparación de Iniciadores

Tomar los viales que contienen los iniciadores y cerrarlos bien, centrifugar 1 a 2 minutos a máxima velocidad. Se preparará un stock (100 μ M) de cada uno de ellos utilizando para re suspender cada uno según esquema agua grado molecular. Para la solución de trabajo se utiliza una concentración de 10 μ M, para lo cual se toman 10 μ l del stock y se disuelve en 90 μ l de agua grado molecular (presentar en anexos cálculos para la preparación de los diferentes iniciadores, el modo de preparación es igual para todos).

Anexo #5

Secuencia de los iniciadores utilizados

coa1 (5'CGAGACCAAGATTCAACAAG)

coa2 (5'AAAGAAAACCACTCACATCAGT)

Anexo 5: Preparación de la solución de trabajo para amplificar el gen coa utilizando iniciadores coa1/coa2.

Reactivo	Concentración Final	Volumen Inicial
Buffer 5 X (+MgCl ₂)	1.0 X	220.0 μ l
dNTP 10 mM	0.25 mM	27.5 μ l
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0.05 U/ μ l	11.0 μ l
COA1 10 mM	0.2 mM	22.0 μ l
COA2 10 mM	0.2 mM	22.0 μ l
Agua ultra pura		775.5 μ l
	Total	1078.0 μl
	Muestra	1.0 μ l c/u
	Volumen Final	50.0 μl c/u

Nota. La reacción se calculó para 22 reacciones.

Anexo #6

Condiciones para la amplificación mediante PCR del gen de la staphylocoagulasa (*coa*).

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min.	
Desnaturalización	94 °C	1 min.	
Hibridación	56 °C	1 min.	x 30
Elongación	72 °C	3 min.	
Elongación final	72 °C	5 min.	

Nota. La temperatura de hibridación varía entre 55 – 57 °C para la región híper variable ya que se debe optimizar.

Anexos #7

Secuencia de iniciadores para *spa* utilizados.

spa1 (5'ATCTGGTGGCGTAACACCTG)

spa2 (5'CGCTGCACCTAACGCTAATG)

Anexo #8

Secuencia de iniciadores *HVR*.

HVR1 (5'ACTATTCCCTCAGGCGTC C3')

HVR2 (5'GGAGTTAATCTACGTCTCATC)

Anexo #9

Optimización de la concentración de cloruro de magnesio (**MgCl₂**) y la temperatura de hibridación para la amplificación de la región híper variable (HVR) asociada a *mecA* de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) con los iniciadores HVR1 y HVR2.

Código	Muestra	Concentración de MgCl ₂	Temperatura de Hibridación		
			55 °C	56 °C	57 °C
49	2370	1.0 mM	-	-	-
		1.3 mM	+	-	-
		1.5 mM	-	+(m)	-
*	4188	1.0 mM	+(t)	-	-
		1.3 mM	+	+	-
		1.5 mM	-	-	-

Nota. La abreviatura (t) significa que la banda observada tiene una intensidad tenue y (m), que se observó más de una banda. *El código correspondiente a la muestra 4188 debe ser un número entre 1 a 47, información que tiene la Lic. Marilena.

Anexo #10

Preparación del master mix para la amplificación de la región híper variable (HVR) asociada a *mecA*

Reactivo	Concentración Final	Volumen Inicial
Buffer 10 X	1.0 X	460.0 µl
MgCl ₂ 25 mM	1.3 mM	239.2 µl
dNTP 10 mM	0.25 mM	115.0 µl
Taq polimerasa 5 U/µl	0.05 U/µl	46.0 µl
HVR1 10 mM	0.2 mM	92.0 µl
HVR2 10 mM	0.2 mM	92.0 µl
Agua ultra pura		3463.8 µl
	Total	4508.0 µl
	Muestra	1.0 µl c/u
	Volumen Final	50.0 µl c/u

Nota. La reacción se calculó para 92 reacciones.