

## RESUMEN

Los *Staphylococcus* resistentes a la meticilina(MRS), son una de las principales causas de Infecciones Nosocomiales, al ser difíciles de erradicar, suelen incrementar el número de infecciones, el costo y el tiempo de hospitalización.

En Bolivia el programa de Vigilancia Epidemiológica de Resistencia a Antimicrobianos (VERA), a cargo del Ministerio de Salud y Deportes, a través un trabajo realizado en el Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica del Instituto Nacional en Salud I.N.L.A.S.A , ha reportado, que del año 1999 al 2000, el incremento de MRSA es del 3 a 6,9 % respectivamente, dicho incremento en nuestro medio, es de alguna manera alarmante, ya que en tan solo un año se habría duplicado el número de estas cepas.

Estudios científicos, revelan que MRS, presenta una gran variabilidad a nivel de una isla genómica llamada SCC *mec* (cassette cromosómico estafilocócico *mec*), que está ausente en cepas de *Staphylococcus* sensibles, dicho elemento no solo confiere resistencia a las Isoxazolil penicilinas, a través del gen *mecA* que codifica la proteína PBP2a y sus reguladores *mecl* y *mecR1*, sino también, posee componentes que le confiere resistencia a todos los demás antibióticos. Dicha variabilidad genética indiscutiblemente, repercute en la expresión Fenotípica, razón por la cual se torna muy difícil detectar la resistencia por métodos Fenotípicos convencionales.

Es por ello y por la falta de datos recientes, que este trabajo pretende analizar si existe una asociación entre los genes implicados en la codificación de PBP2a con la expresión Fenotípica de resistencia a la meticilina en cepas de *Staphylococcus* spp. circulantes en nuestro medio.

Se determinó la resistencia y/o sensibilidad de un total de 67 aislamientos, 60 *S. aureus* y 7 *Staphylococcus* coagulasa negativo (S.C.N), mediante pruebas Fenotípicas (difusión en disco, concentración inhibitoria mínima CIM y producción de PBP2a ) y pruebas Genotípicas que permitieron detectar los genes *mecA* y sus reguladores *mecR1* y *mecl* utilizando el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se obtuvo cierto porcentaje de discordancia aun entre las pruebas Fenotípicas. De 9 cepas de *S. aureus* resistentes por difusión en disco 1 fue sensible por CIM, 7 cepas resistentes por CIM, fueron sensibles por difusión en disco. Las 7 cepas de S.C.N sensibles por difusión en disco son resistentes por CIM. Por el método de producción de PBP2a, los resultados fueron discordantes con la prueba de difusión en disco en 20 % y con CIM en 34 %.

El análisis Genotípico, revela que de 60 cepas de *S. aureus* 10 (17%), y de 7 cepas de S.C.N 4 (57%) son portadoras del gen *mecA*. De las 10 cepas de *S. aureus* *mecA* positivo, 5 portan el gen *mecR1* (3 intacto y 2 con alteraciones a nivel de su secuencia) y 7 portan el gen *mecl*. De las 4 cepas de S.C.N *mecA* positivo 2 portan el gen *mecR1* (ambas con alteración en sus secuencias) y 2 portan el gen *mecl*.

De las cepas de *S.aureus* , 3 podrían portar el SCCmec tipo II, otras 3 el tipo III, 1 podría ser del tipo I o IV y 3 no corresponden a ningún tipo de cassette cromosómico. En cuanto a las cepas S.C.N; 1 podría ser tipo I o IV, 1 el tipo III y 2 no corresponden a ningún tipo.

Concluimos que no existe asociación entre el Fenotipo y el Genotipo en cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a la meticilina, ya que la resistencia obedece a múltiples factores que las pruebas Fenotípicas clásicas no pueden englobar

# 1 INTRODUCCIÓN

Las cepas de *Staphylococcus* meticilina - resistentes (MRSA) fueron identificadas en 1961 (i), cuando se introdujeron las primeras penicilinas penicilinasas resistentes (meticilinas) en la práctica clínica. Esta resistencia fue denominada "intrínseca" ya que no se debía a la destrucción del antibiótico por la  $\beta$ -lactamasa. Estas cepas son capaces de crecer en presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y sus derivados, incluyendo cefalosporinas (ii).

La primera epidemia de infección causada por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente ocurrió en hospitales europeos en la década de los años sesenta (i, iii). Desde entonces, las cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivos y negativos meticilina resistentes se han diseminado a nivel mundial y establecido no solamente en hospitales sino también en pacientes ambulatorios (i, iv).

Datos epidemiológicos muestran que MRSA es una de las principales causas de infecciones nosocomiales a nivel mundial y ocurre en más del 20 a 40 % de todas las infecciones por *Staphylococcus* (i, iii).

En Estados Unidos, la prevalencia de MRSA se incrementó de 2.4% en 1975 a 29 % en 1991 (v); similares resultados se reportaron en Europa, donde hubo un incremento de 1.7 % en 1990 a 8.7% en 1995 (vi); en Australia se ha llegado a niveles endémicos de 20 a 40 % (vii). Los datos de Asia y África son esporádicos, sin embargo, entre 1988 y 1998 se reportó un incremento de 2% hasta 44.5% (viii).

En cuanto a países Latinoamericanos, la Organización Panamericana de la Salud revela que de 1991 a 1997 el incremento fue de 4% hasta 27 % (ix).

En Bolivia, los registros epidemiológicos del programa de Vigilancia Epidemiológica de Resistencia a los Antimicrobianos (VERA) revelan que el año 1999 MRSA intrahospitalario tuvo una frecuencia del 3%. El año 2000 la frecuencia reportada es del 6,9% (x). Este incremento puede obedecer a fallas de diagnóstico en MRSA en años previos, y que fue mejorando con el tiempo. Otra probable razón puede ser la diseminación de estas cepas.

Las formas más prevalentes de resistencia a Meticilina están caracterizadas por una proteína de unión a la penicilina (PBP) ligeramente diferente, denominada PBP2a (o PBP2') que es inducible y está codificada por el gen *mecA*, que es parte de un cassette cromosómico: *mec* (SCC*mec*) del cual existen 4 tipos estructuralmente diferentes (i,xi,xii), encontrados en cepas resistentes pero no en cepas sensibles (xiii).

Sin embargo la sola presencia del gen *mecA* no es suficiente para la expresión óptima de resistencia a Meticilina, siendo crucial la presencia de los genes *mecR1* y

*mecl*, que codifican proteínas reguladoras tanto de expresión como de supresión de este gen. (i,<sup>xiv</sup>,<sup>xv</sup>).

El origen del gen *mecA* y de *SCCmec* no está todavía bien dilucidado, pero el gen, y las regiones que lo flanquean, han sido encontrados en otras especies de *Staphylococcus*. Un posible ancestro es la especie animal *Staphylococcus sciuri* (<sup>xvi</sup>), que tiene un 80 % de homología de secuencia con *mecA* de *S. aureus*, sin embargo no confiere resistencia. Por otro lado, estudios genéticos y epidemiológicos, sugieren que este elemento es adquirido en *S. aureus* por transferencia horizontal de *Staphylococcus* coagulasa negativo (<sup>xvii</sup>).

## 2 JUSTIFICACIÓN

Como es posible evidenciar, los datos referentes a MRSA en Bolivia, llaman la atención en gran manera, mostrando un aparente incremento del 3% al 6,9% en un año. Si esto es real, *Staphylococcus* spp. merece suma atención. Primero, para verificar este incremento, y segundo, para establecer su comportamiento epidemiológico.

La identificación de los genes implicados en la codificación de la proteína responsable de la meticilina resistencia, daría información valiosa en lo concerniente a la evolución de esta resistencia. Las cepas no meticilina resistentes, que portan el gen *mecA*, están un paso al frente para la aparición de la resistencia, que al ser identificadas permitirían pronosticar el incremento en el futuro de cepas MRSA.

La identificación de los genes reguladores de la expresión de la PBP2a es crucial, porque requiere ser comparada con la expresión fenotípica de la resistencia, además de que su frecuencia relacionada con el tiempo permitiría determinar la velocidad de transmisión tanto entre especies como intraespecies. Siendo que existen fuertes sospechas de la transferencia de ADN de forma horizontal, podríamos tener un indicador indirecto de este mecanismo.

Por último, conocer la frecuencia de los diferentes tipos de regulones presentes en *SCCmec*, podría proveer información fundamental acerca de la expresión de la PBP2a, incluyendo el número de estos regulones en cada cromosoma.

Todo lo anteriormente descrito, responde a las características genotípicas de las cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes, que indiscutiblemente, se expresaran fenotípicamente.

Así, este trabajo pretende, mediante un análisis de dichas características, demostrar, si existe o no una asociación real de ambas, en cepas circulantes en nuestro medio. Información que es relevante, no solo con el fin de aportar datos científicos, sino para informar al personal que trabaja en salud especialmente, el comportamiento que debe adoptar frente al hallazgo de estas cepas, enfocado, no solo al tratamiento y diagnóstico, sino, esencialmente al momento de realizar las diferentes pruebas de resistencia y sensibilidad, que si están realizadas correctamente dará lugar a un tratamiento exitoso.

## 3 ANTECEDENTES

En una serie de observaciones clínicas y estudios de laboratorio publicados en 1880 y 1882, Ogston describió las enfermedades por *Staphylococcus* y su rol en la producción de abscesos y sepsis <sup>(xviii)</sup>. Más de 100 años más tarde, el género *Staphylococcus*, permanece como uno de los patógenos humanos más versátiles y peligrosos. Tanto la frecuencia de infecciones adquiridas en hospitales como ambulatoriamente, se han incrementado continuamente, con muy poco cambio en cuanto a la mortalidad. El tratamiento de estas infecciones se ha tornado muy dificultoso, debido a la aparición de cepas multirresistentes a antimicrobianos.

### 3.1 PENICILINAS RESISTENTES A LA PENICILINASA (ISOXAZOLILPENICILINAS)

Este grupo de compuestos semisintéticos, comprende a la metilina, flucloxacilina, nafcilina, dicloxacilina, oxacilina y cloxacilina derivadas de la penicilina G, por adición de un radical isoxazolil al ácido 6-aminopenicilánico; este radical puede estar solo, o acompañado de un átomo de Fluor o de Cloro, modificaciones que le confieren resistencia frente a la penicilinasa elaborada por el *S. aureus* <sup>(xix)</sup>.

Este grupo de compuestos tolera la acción del ácido gástrico (característica que permite su administración por vía oral); son menos activos que la penicilina G contra organismos sensibles a la penicilina; por tanto su uso debe limitarse al tratamiento de infecciones por *Staphylococcus* productores de penicilinasa. Este grupo de antibióticos no es activo frente a los *Staphylococcus* metilina resistentes (MRSA y MRSE), los cuales requieren tratamiento con vancomicina, teicoplanina o quinupristina - dalfopristina <sup>(xix)</sup>.

#### 3.1.1 Espectro antimicrobiano

Estos compuestos son principalmente activos frente a *Staphylococcus aureus* productor de betalactamasa (MIC de 0,5 mg/L para cloxacilina, 1.1mg/L para dicloxacilina, 3.1mg/L para metilina y 1.6mg/L para oxacilina, respectivamente) y frente a otros *staphylococcus*. Sin embargo, existen algunas especies de *staphylococcus* que son tolerantes.

El punto de corte (Metilina) para *S. aureus* es CIM  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  (sensible) y CIM  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  (resistente) y para *S. coagulasa* negativos es CIM  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$  (sensible) y CIM  $\geq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  (resistente) <sup>(xix)</sup>.

### 3.2 COMPONENTES DE LOS STAPHYLOCOCCUS Y SUS PRODUCTOS

*Staphylococcus aureus* es un miembro de la familia Micrococcaceae. Examinándolos microscópicamente, aparecen como cocos gram positivos agrupados en racimos. Se distingue de otras especies de *Staphylococcus* en base al pigmento dorado que producen las colonias, así como resultados positivos para coagulasa, fermentación de manitol, y test de deoxirribonucleasa.

Los *staphylococcus* coagulasa negativos, antiguamente eran considerados contaminantes de poca importancia clínica. Sin embargo en estas dos últimas décadas, estos microorganismos han sido reconocidos como agentes importantes de enfermedades humanas (xx, xxi, xxii, xxiii, xxiv, xxv, xxvi, xxvii).

### 3.2.1 Genoma

El genoma de *Staphylococcus* consiste en un cromosoma circular (aproximadamente 2800 kpb) con profagos, plásmidos y transposones. Los genes que controlan la resistencia a antibióticos y la virulencia, se encuentran en el cromosoma, así como otros elementos extracromosómicos (xxviii), mediante los cuales son transferidos genes entre cepas y especies de *Staphylococcus*, o a otras especies de gram -positivos (Figura 1).

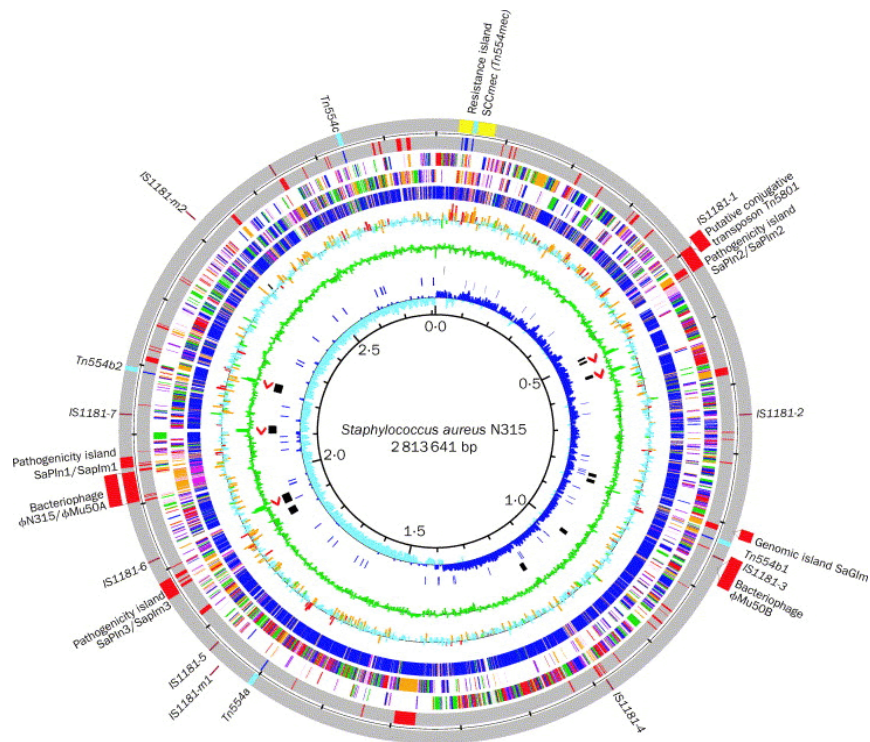


Figura 1. Representación circular del cromosoma de *Staphylococcus aureus*, cepa N315 (Fuente: xxix)

### 3.2.2 Pared celular

La pared celular de *Staphylococcus* está constituida por peptidoglicano que representa el 50% de su peso. El mismo, consta de subunidades alternas de polisacáridos N- acetilglucosamina y N-acetilmurámico, con uniones  $\beta$ -1,4. Las cadenas de peptidoglicano están entrecruzadas por cadenas tetrapeptídicas, unidas al ácido N-acetilmurámico, y por un puente de pentaglicina, específico para *S. aureus*.

El peptidoglicano podría tener actividad parecida a la de exotoxina, estimulando la liberación de citoquinas por parte de los macrófagos, activación del complemento y agregación plaquetaria. Las diferencias en la estructura del peptidoglicano de las cepas de *staphylococcus* pueden contribuir a variaciones en su capacidad de causar coagulación intravascular diseminada (xvi). Los ácido teicoicos de ribitol, unidos covalentemente al peptidoglicano, son los principales constituyentes de la pared celular. El ácido lipoteicoico, es un polímero glicerol fosfato, unido a los glicolípidos terminales anclados a la membrana citoplasmática (Figura 2).

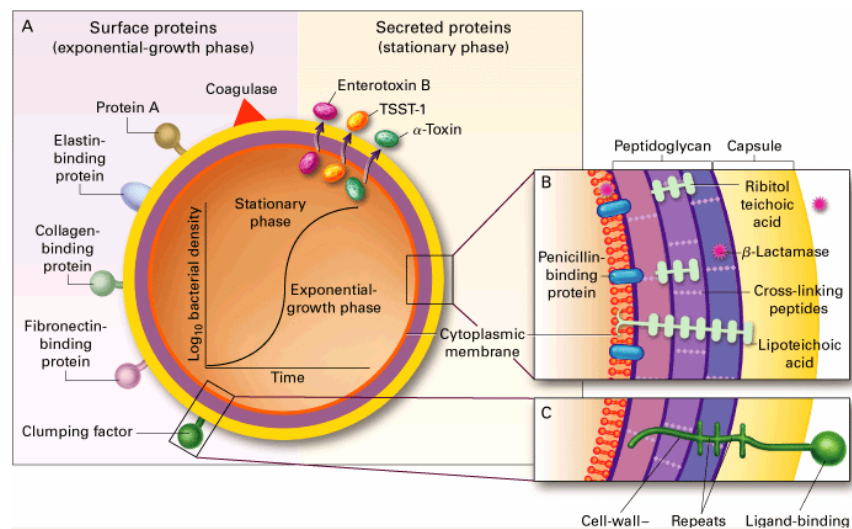


Figura 2. Estructura de la Pared Celular de *Staphylococcus aureus*. (Fuente: xviii)

### 3.2.3 Cápsula

La mayoría de los *Staphylococcus* producen microcápsulas. De los 11 serotipos de polisacáridos microcapsulares que han sido identificados, los tipos 5 y 8 aparecen en el 75 % de las infecciones humanas. La mayoría de los *S. aureus* meticilina resistentes aislados, son tipo 5. La composición química de cuatro de estos polisacáridos antifagocíticos, incluyendo los anteriores ha sido determinada y todos están químicamente relacionados (xvii).

### 3.2.4 Proteínas de superficie

Muchas proteínas de superficie tienen muchas características estructurales en común. Estas incluyen una secuencia de señal secretoria en el extremo N-terminal, aminoácidos positivamente cargados que se extienden en el citoplasma y dominios de membrana que limitan la membrana, y una región de anclaje a la pared celular; todos en el extremo carboxi-terminal. Un dominio de unión-ligando en N-terminal, que está expuesto en la superficie de la célula bacteriana permite a algunas de estas proteínas funcionar como adhesinas (iii). La proteína A que es un prototipo de estas proteínas, tiene propiedades antifagocitarias, basadas en su habilidad de unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas.

Muchas de estas proteínas relacionadas, se unen a las moléculas de la matriz extracelular y han sido designadas como componentes microbianos de superficie, que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMM). Estudios recientes, sugieren que estas juegan un rol importante en la habilidad de *staphylococcus* para colonizar el tejido humano.

### 3.2.5 Toxinas

Los *Staphylococcus* producen numerosas toxinas que se agrupan en base a su mecanismo de acción. Las citotoxinas, como la alfa-proteína de 33Kd, promueve la formación de poros e induce cambios proinflamatorios en células animales. El daño celular consecuente puede contribuir a la manifestación del síndrome séptico (xxx, xxxi).

Las toxinas pirógenas extremadamente antigénicas están estructuralmente relacionadas, ya que tienen homología de secuencia. Ellas actúan como súper antígenos por unión a las proteínas clase II del complejo de histocompatibilidad (MHC), causando proliferación extensa de las células T y liberación de citoquinas. Diferentes dominios de las exotoxinas, son responsables de las dos enfermedades, causadas por estas proteínas: el síndrome de shock tóxico y la infección alimenticia.

A pesar de su baja homología en aminoácidos, la toxina 1 del síndrome de shock tóxico es estructuralmente similar a las enterotoxinas B y C. El gen de la toxina 1, del síndrome de shock tóxico se halla en 20 % de aislamientos de *S. aureus*. La toxina exfoliativa, incluyendo las epidermolíticas A y B, causan eritema como la observada en el síndrome de piel escaldada por *Staphylococcus*. Finalmente, la leucocidina de Pantón – Valentín, es una toxina leucocítica, que ha sido epidemiológicamente asociada con muchas infecciones cutáneas (xxxii).

### 3.2.6 Enzimas y otros componentes bacterianos

*Staphylococcus* produce varias enzimas como ser proteasas, lipasas e hialuronidasas, que destruyen tejidos. Estos productos bacterianos pueden facilitar la



diseminación a tejidos adyacentes, aunque el rol en la patogénesis, no está bien definido.

La  $\beta$ -lactamasa es una enzima, que inactiva la penicilina. Las proteínas de unión a la penicilina, se encuentran en la membrana citoplasmática implicadas en el ensamblaje de la pared celular (<sup>xxxiii</sup>). Un nuevo tipo de proteína de unión a la penicilina es responsable de la resistencia a las penicilinasas resistentes a la penicilina y a las cefalosporinas.

La coagulasa, es un activador de la protrombina, convierte el fibrinógeno en fibrina. Su contribución como factor de virulencia, es aún incierta.

### **3.3 REGULACIÓN GÉNICA DE LA EXPRESIÓN DE LOS DETERMINANTES DE VIRULENCIA**

Los genes reguladores globales, que coordinan la expresión de varios grupos de genes estafilocócicos, han sido identificados (<sup>xxxiv,xxxv</sup>). El gen más extensamente estudiado es *agr*, que induce la expresión de exoproteínas (proteínas extracelulares) y suprime la expresión de proteínas de superficie, que son principalmente sintetizadas durante la fase de crecimiento exponencial, y las proteínas de secreción durante la fase estacionaria.

Esta expresión secuencial de genes, podría tener importancia clínica. Diferentes estadios de la infección estafilocócica, parecen requerir diferentes paneles de determinantes de virulencia. Durante la fase inicial de la infección, la expresión de proteínas de superficie que se une a las moléculas de la matriz extracelular favorece una colonización exitosa al tejido celular, mientras que la síntesis de exoproteínas, favorece la diseminación a tejidos adyacentes. Esta hipótesis es sustentada por estudios realizados en animales, que muestran que la inactivación de genes reguladores, reduce la virulencia bacteriana (<sup>xxxvi</sup>).

### **3.4 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR STAPHYLOCOCCUS**

*Staphylococcus* es causante de una gran variedad de enfermedades, desde infecciones ligeras en la piel, hasta infecciones sistémicas severas, que ponen en alto riesgo la vida de los pacientes (<sup>xxxvii</sup>). Es una causa común de infecciones cutáneas y subcutáneas, incluyendo foliculitis, furunculosis, celulitis, mastitis e impétigo y principalmente abscesos, que pueden ser de difícil tratamiento, los mismos que deben ser drenados quirúrgicamente, así como en la foliculitis, mientras que la celulitis, es generalmente tratada con antimicrobianos. El Impétigo puede ser muy benigno, hasta llegar a un potencial síndrome de piel escaldada (<sup>xxxviii</sup>).

*S. aureus* está comúnmente asociado a infecciones post operatorias, infecciones relacionadas con catéteres, Síndrome de Shock Tóxico(SST), e intoxicaciones

alimentarias, estas últimas están mediadas por toxinas, Las intoxicaciones alimentarias comunes se autolimitan y son causadas por la enterotoxinas presentes en alimentos contaminados con *Staphylococcus* y se caracterizan por náuseas, vómitos y algunas veces diarrea, los síntomas comienzan 4 a 5 horas luego de la ingesta de alimentos contaminados (xxxix, xl).

TSS causada por la toxina TSST-1, es una condición potencialmente fatal, comúnmente asociada al uso de tampones absorbentes, pero también se han visto en infecciones por *S. aureus* no invasivas en niños. Los síntomas incluyen fiebre alta, escozor y eritema múltiple o localizado, descamación de la piel, hipotensión e implicación de múltiples órganos (xli, xlii, xliii).

Las infecciones más serias producidas por *S. aureus* incluyen Osteomielitis, neumonía, sepsis, endocarditis aguda, miocarditis, pericarditis, encefalitis, meningitis, síndrome de piel escaldada y abscesos en sitios estériles (xxxvii). Las sepsis por *S. aureus* generalmente se originan en focos infecciosos locales, las sepsis complicadas pueden diseminarse por vía hematológica a otros órganos, como corazón, huesos y articulaciones.

Los tipos de infecciones asociadas con los estafilococos coagulasa negativos incluyen las siguientes:

Infecciones urinarias, nosocomiales y adquiridas en la comunidad (xliiv) infecciones producidas por dispositivos permanentes (válvulas cardíacas, protésicas, catéteres intravenosos, prótesis articulares, implantes de bombas intratecales, derivaciones para hemodiálisis, etc.), bacteremia en huéspedes comprometidos, endocarditis de válvulas cardíacas naturales y protésicas (xliiv), osteomielitis, endooftalmítis posquirúrgica.

### **3.5 PATOGÉNESIS DE STAPHYLOCOCCUS EN LA INVASIÓN DEL TEJIDO**

Los estafilococos circulantes se unen a los sitios de daño endovascular, donde se ha formado un complejo trombo-plaqueta-fibrina (PFT). La bacteria puede atacar a través de un mecanismo mediado por moléculas de la matriz adhesiva, que reconoce componentes de la superficie microbiana (MSCRAMM). Alternativamente, se pueden adherir a las células endoteliales directamente, a través de interacciones adhesina-receptor, o por medio de ligandos, que incluyen constituyentes del suero, como fibrinógeno.

Las modificaciones del endotelio, que resultan de los cambios microambientales, como alteraciones de la matriz extracelular, pueden señalar cambios en la susceptibilidad celular a la infección. Luego de la fagocitosis por células endoteliales, la bacteria elabora enzimas proteolíticas, que facilitan la diseminación a tejidos adyacentes y la liberación del *Staphylococcus* al torrente sanguíneo. Los

factores tisulares son expresados por células epiteliales infectadas, facilitando la deposición de fibrina.

Una vez en los tejidos subepiteliales adyacentes, la bacteria produce una respuesta inflamatoria, que resulta en la formación de abscesos. Esta secuencia de eventos, contribuye al establecimiento de focos metastásicos de la infección, así como a la patogénesis de endocarditis cuando se encuentra implicado el endotelio cardiaco.

Luego de la fagocitosis, las células endoteliales expresan receptores Fc y moléculas adhesivas, moléculas de adhesión a las células vasculares (VCAM) y moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y liberan interleucina 1, interleucina 6, interleucina 8 y factor de necrosis tumoral (TNF), luego de la exposición al estafilococo. La activación de los macrófagos ocurre luego de la liberación de interferón gamma por las células T (xviii).

La liberación de citocinas al torrente sanguíneo por parte de los monocitos o macrófagos, así como las células endoteliales, contribuyen a la manifestación del síndrome séptico y vasculitis, asociada con enfermedad estafilocócica sistémica. La expresión de los receptores Fc, puede contribuir a la vasculitis, ocasionalmente encontrada durante la bacteriemia, actuando como sitio de unión para la inmunoglobulina (Ig) o complejos inmunes (Figura 3)

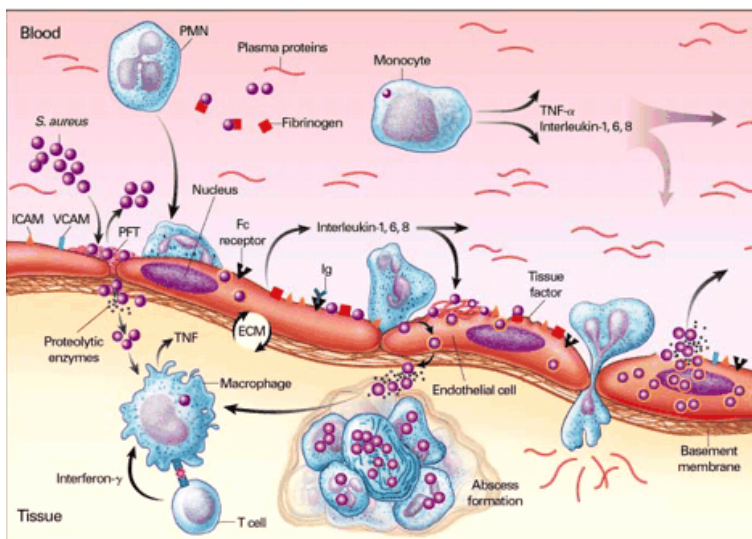


Figura 3. Mecanismo de la invasión estafilocócica en tejido (Fuente: xviii)

### 3.6 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES ESTAFILOCÓCICAS

### 3.6.1 Colonización e infección

Los humanos son reservorios naturales de *S. aureus*; 50 % de adultos saludables, están colonizados con un 10 a 20 % de manera persistente <sup>(xlv)</sup>. Tanto *Staphylococcus* sensibles, como resistentes a la meticilina, son colonizadores persistentes. Las personas colonizadas con *S. aureus*, tienen riesgo incrementado para subsecuentes infecciones.

Las personas con mayor tendencia a infecciones estafilocócicas, son aquellas con diabetes tipo I <sup>(xlvi)</sup>, usuarios de drogas intravenosas, pacientes con hemodiálisis <sup>(xlvii)</sup>, pacientes quirúrgicos <sup>(xlviii, xlix)</sup> y pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (I), así como pacientes con función leucocitaria deficiente.

### 3.6.2 Transmisión

La mayor parte de los casos son intrahospitalarios, adquiridos por exposición a las manos de los trabajadores en salud, luego de que ellos han sido transitoriamente colonizados, o por contacto con otros pacientes. Las epidemias también resultan por la exposición a portadores a largo plazo y por fuentes ambientales, sin embargo, estos modos de transmisión son poco comunes <sup>(xviii)</sup>.

## 3.7 RUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS

### 3.7.1 Morfología de las colonias

Las especies de *Staphylococcus*, producen colonias características en agar sangre de carnero, tienen de 1 a 2 mm de diámetro después de 24 horas de incubación, aunque algunos pueden formar colonias más pequeñas durante este lapso. Las colonias son habitualmente lisas, mantecosas y ligeramente convexas, con bordes enteros. Algunas cepas de *S. aureus* pueden ser pigmentadas, de amarillo o amarillo naranja, en tanto que otras cepas pueden producir colonias de color marfil o grises <sup>(li)</sup>.

Algunos *S. aureus* y algunas especies coagulasa negativas, pueden tener una zona evidente o difusa, de betahemólisis alrededor de las colonias; esta propiedad hemolítica, se hace evidente solo después de una incubación prolongada <sup>(li)</sup>

### 3.7.2 Frotis directos teñidos con Gram

En los frotis directos, teñidos con Gram, provenientes de muestras clínicas, los *Staphylococcus* aparecen como cocos Gram-positivos, o Gram variables, de un tamaño que varía, de 0.5 a 1 µm de diámetro. Pueden aparecer aislados, en pares, en cadenas cortas o en grupos, tanto dentro, como fuera de los leucocitos polimorfonucleares <sup>(li)</sup>.

← Con formato: Numeración y viñetas

### 3.7.3 Prueba de la Catalasa

Con formato: Numeración y viñetas

Los microorganismos de la familia Micrococcaceae, se diferencian de la familia Streptococcaceae, por la prueba de la catalasa. Esta prueba detecta la presencia de citocromooxidasas en las Micrococcaceae. La prueba se hace con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% sobre un portaobjetos. La producción inmediata de burbujas, indica la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso (li).

### 3.7.4 Prueba de la Coagulasa

Con formato: Numeración y viñetas

El clásico criterio para la identificación de *S. aureus*, es que puede agruparse en el plasma, vía la actividad de coagulasa libre extracelular, también llamada estafilocoagulasa. Se cree que la coagulasa libre interactúa con la protrombina en el plasma para producir estafilotrombina, la cual convierte a la protrombina en una forma activa que libera fibrinopéptidos a partir del fibrinógeno, formando coágulos de fibrina (lii).

Existen otros procedimientos alternativos para la prueba de la coagulasa, son la aglutinación con látex, hemaglutinación pasiva, además de otros procedimientos confirmatorios adicionales, como ser la prueba de la Desoxirribonucleasa, prueba de la Endonucleasa Termoestable, fermentación de Manitol y otros (li, liii).

### 3.7.5 Identificación de *Staphylococcus Coagulasa* - negativo

Con formato: Numeración y viñetas

Como fue descrito anteriormente, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, son los *Staphylococcus* coagulasa negativos, aislados con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos que trabajan con muestras humanas. Debido a la reconocida importancia clínica de *S. saprophyticus* en las infecciones urinarias y a la importancia de *S. epidermidis*, como agente causal de infecciones graves, es importante que los laboratorios empleen métodos de identificación definitiva para estas dos especies (li).

Las técnicas tradicionales aplicadas para la detección de estas especies están resumidas en la Figura 4.

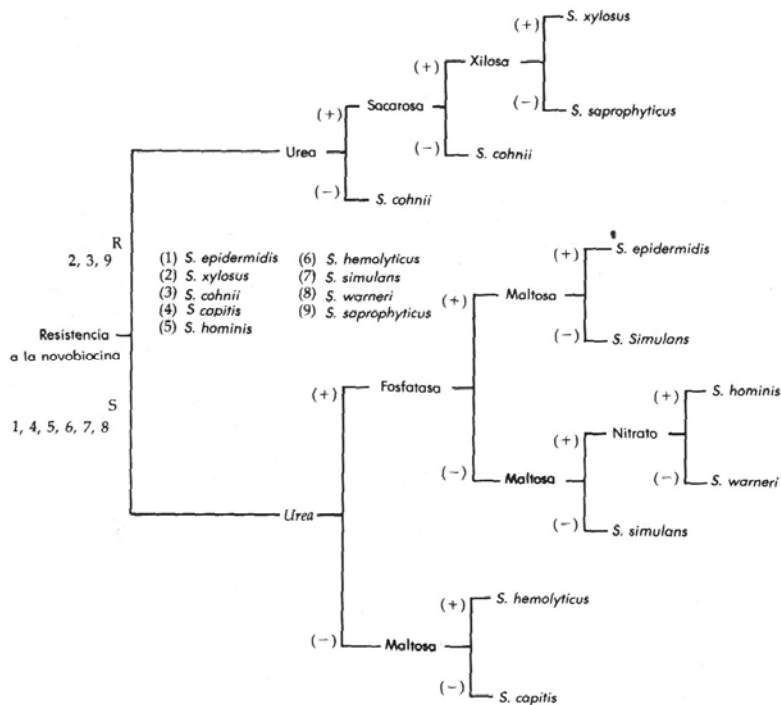


Figura 4. Esquema para la identificación de *Staphylococcus* Coagulasa Negativos (Fuente: li).

### 3.8 STAPHYLOCOCCUS METICILINO RESISTENTES

Las cepas de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina, son capaces de crecer en presencia de  $\beta$ -lactámicos y sus derivados, incluyendo cefalosporinas y penicilinas estafilocócicas. La resistencia leve a las meticilinas puede ser el resultado de la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas, el aumento en la producción y/o la modificación en la unión a la penicilina de las PBP (liv,lv).

Sin embargo la más relevante y prevalente forma de resistencia a la meticilina, está caracterizada por la producción de una proteína de unión a la penicilina adicional, denominada PBP2a (PBP2') (lvi,lvii,lviii). PBP2a probablemente a evolucionado por recombinación de un gen de la penicilinasas y un gen PBP similar a PBP2 y PBP3 de *Escherichia coli* (lix). PBP2a tiene una baja afinidad inusual por todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, substituyendo los PBPs nativos y permitiendo un continuo ensamblaje de la pared celular (lvii,lx). Sin embargo la sola producción de PBP2a no es suficiente para una expresión óptima de la resistencia a la meticilina (lxi). La PBP2 nativa provee una función transglicosilasa en la elongación de la cadena de peptidoglicano y PBP2a es requerida para la función transpeptidasa (lxii).

#### 3.8.1 Cassette Cromosómico SCC *mec* (*mec* ADN)

En los últimos años, el entendimiento de las bases genéticas de la resistencia a la meticilina ha avanzado significativamente, esta resistencia es producida cuando *staphylococcus* sensibles adquieren un elemento genético llamado cassette cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) que es un elemento genético móvil compuesto por el complejo *mec* y el complejo *ccr* que codifican las recombinasas responsables de la inserción y escisión de este elemento, está presente en cepas de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina <sup>(lxiii)</sup>; *mec* se encuentra siempre cerca del grupo de genes *pur-nov-his* del cromosoma de *S. aureus* (Figura 1).

El complejo *mec* contiene a *mecA*, el gen estructural de la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a), *mecI* y *mecR1*, que son elementos reguladores, que controlan la expresión de *mecA* <sup>(lxiv, lxv)</sup>. *mecA* es inducible, y es parte del cromosómico estafilocócico (*SCCmec*) <sup>(lxvi, lxvii, lxviii)</sup>.

La secuencia de la región cromosómica donde se inserta *SCCmec* parece ser altamente homologa entre diferentes cepas. Además de *mecA*, este cassette alberga un grupo variable de genes no relacionados con la resistencia a la meticilina, sirviendo como sitio de integración para varios otros determinantes de resistencia, transposones y plásmidos. Han sido identificados 4 tipos de *SCCmec* (*SCCmec* I al IV), estructuralmente diferentes (Figura 5) <sup>(lxix, lxx, lxxi)</sup>, todos con características comunes, incluyendo el gen *mecA* y parte de su región reguladora. Aunque está en estudio un quinto tipo de cassette, que correspondería al V. <sup>(clii)</sup>

Los genes *mecR1* y *mecI*, codifican proteínas reguladoras de *mecA*. MecR1 es una proteína transductora de señal, con un dominio de unión a la penicilina y un dominio transmembrana, y Mec I, una proteína represora del gen *mecA* <sup>(lxxii, lxxiii, lxxiv)</sup>.

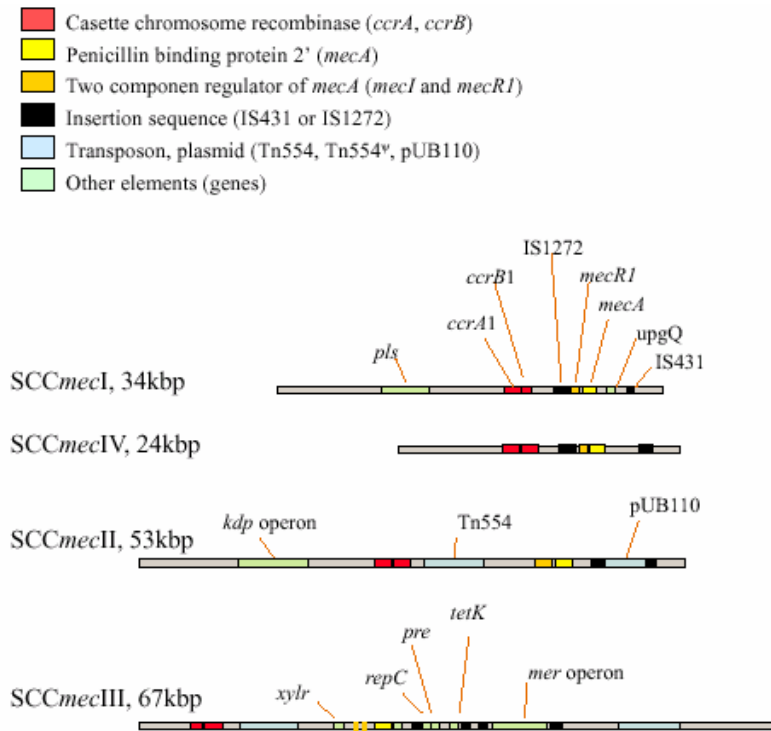


Figura 5. Composición genética de los cuatro tipos de cassetes SCCmec. (Fuente: )

La expresión de la resistencia a la meticilina varía entre diferentes cepas (<sup>lxxv, lxxvi, lxxvii</sup>). Las cepas con los regulones *mecI* - *mecR1* intactos, son fenotípicamente sensibles a la meticilina, ya que *mecA* es reprimido eficientemente por Mecl (<sup>lxxviii</sup>).

La expresión constitutiva de resistencia a la meticilina, requiere de alteraciones de los genes reguladores y ausencia de los genes reguladores de la β-lactamasa (*blaI* y *blaRI*), los cuales son también capaces de reprimir a *mecA* (<sup>lxxix</sup>). Los aislamientos clínicos de MRSA, muestran deleciones en *mecI* y en algunas regiones de *mecR1* o mutaciones en *mecI* o en la región promotora de *mecA* (<sup>lxxx, lxxxi</sup>).

### 3.8.2 Evolución de MRSA

Las primeras cepas de MRSA fueron descritas en 1961 (<sup>lxxxii</sup>), en el mismo periodo en el cual la meticilina fue introducida para uso clínico. El origen del gen *mecA* y SCCmec, es desconocido, pero el gen *mecA* y sus regiones flanqueantes, han sido también detectados en otras especies de *Staphylococcus*. Una posible fuente es *Staphylococcus sciuri*, ya que varios estudios sugieren que *mecA* es un elemento nativo de *S. sciuri* mostrando un 88% de similitud genómica con *mecA* de MRS; este estudio estuvo basado en más de cien aislamientos independientes, de diferentes fuentes ecológicas, que presentaron una gran variedad genotípica (<sup>lxxxiii</sup>). Sin



embargo, la mayoría de estos aislamientos no mostraron resistencia a la meticilina (lxxxiv, lxxxv).

El modo de transferencia del gen *mecA* de un donador desconocido a *S. aureus*, ha sido sujeto de debate. Inicialmente, se creía que las cepas de MRSA eran descendientes de un ancestro común, ya que mostraban pigmentación diferente a las cepas de *S. aureus* meticilina sensibles (MSSA), capacidad de sobrevivencia invariable y un perfil de resistencia típico (lxxxvi).

Posteriormente, su clonalidad fue estudiada en una manera más precisa, usando una colección de cepas MRSA de 472 aislamientos de diferentes áreas geográficas, además de sondas de ADN para la región del *mecA* y Tn554. Fueron encontrados 29 patrones Tn554 y 6 diferentes patrones *mecA*, cada patrón Tn554 asociado con un solo patrón de *mecA*, lo cual sugiere que el polimorfismo de Tn554 surgió luego de la integración de *mecA* en el cromosoma de *S. aureus* (lxxxvii). De todos modos, otro estudio sugiere que *mecA* se integró en diferentes linajes de *S. aureus*, lo cual se evidencia por las diferencias en tamaño de algunas proteínas bien conservadas evolutivamente (lxxxviii). Los mismos perfiles de la proteína están en las cepas comunes de MSSA.

De todos modos parece ser que la transferencia horizontal de SCC*mec* es un evento relativamente raro aunque la transferencia horizontal del material genético en otras ocasiones juega un rol muy importante en la evolución *S. aureus* (lxxxix, xc).

### 3.8.3 Tipos de Resistencia a la Meticilina

#### 3.8.3.1 Resistencia Heterogénea

Una característica distintiva de la resistencia a la meticilina es su naturaleza heterogénea (xci, xcii). La mayoría de las células en las cepas heterogéneas (típicamente 99.9%) son susceptibles a bajas concentraciones de  $\beta$ -lactámicos, es decir de 1-5  $\mu\text{g/ml}$  de meticilina, con solo una pequeña porción de células ( $1$  en  $10^6$ ), que crecen a concentraciones de meticilina de 50  $\mu\text{g/ml}$  o más.

Las cepas heterogéneas pueden parecer homogéneas, bajo algunas condiciones de cultivo, como ser el crecimiento en medio de cultivo hipertónico, suplementado con NaCl, sucrosa o incubación a 30°C.

La adición de EDTA pH 5.2 o incubación de 37 a 43°C, favorece el patrón heterogéneo y puede suprimir la resistencia enteramente. Estos cambios en la expresión de la resistencia con diferentes condiciones de cultivo son transitorios y enteramente fenotípicos. El pasaje de una cepa heterogénea en la presencia de antibiótico  $\beta$ -lactámico altera el fenotipo de resistencia, seleccionando clones mutantes altamente resistentes. Estos clones producen poblaciones homogéneas de células altamente resistentes que pueden crecer a concentraciones de meticilina de 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Esta característica tiende a ser inestable ya que con sus cultivos

repetitivos en medio libre de antibiótico la proporción de células altamente resistentes disminuye gradualmente y el patrón original heterogéneo emerge.

#### 3.8.3.2 Resistencia Borderline

Otro tipo de resistencia a la meticilina, es aquel exhibido por las cepas resistentes a la Meticilina de tipo Borderline, denominadas BORSA .

Estas cepas se caracterizan por presentar Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) a la meticilina, justo por encima del punto de susceptibilidad (CIM Meticilina de 4 a 8 µg/ml) estas cepas se pueden dividir en dos categorías en base a la presencia del *mecA*. Las cepas Borderline que contienen *mecA* son cepas resistentes a la meticilina, extremadamente heterogéneas, que producen PBP2a (<sup>xciii</sup>). Estas cepas tienen una subpoblación de células resistentes, aunque muy pequeña que puede crecer a altas concentraciones de droga.

Las cepas Borderline, que no contienen el *mecA*, pueden ser diferenciadas fenotípicamente de las *mecA* positivas, en que no existen clones altamente resistentes. Una hipótesis, es que la resistencia Borderline en cepas *mecA* negativas, resulta de modificaciones en los genes PBP normales o por hiperproducción de β-lactamasa estafilocócica (<sup>xciv</sup>).

#### 3.8.3.3 Resistencia Homogénea

El fenómeno de la resistencia homogénea en cepas de tipo salvaje, no está completamente explicado. Este tipo de resistencia se logra por exposición de cepas con regulones *mecA* intactos a altas concentraciones de meticilina (128 µg/ml), la población celular entera de estas cepas es uniformemente resistente incluso a concentraciones de 512 µg/ml (<sup>xcv,xcvi</sup>), Ryffel et al., demostró que además de la producción de PBP2a, para que ocurra una conversión de fenotipo hétero a homo resistente se requiere una mutación cromosómico designada *chr\** (<sup>xcvii</sup>).

#### 3.8.3.4 Resistencia eagle-type

Este tipo de resistencia se caracteriza por presentar resistencia a altas concentraciones de meticilina (64-512 µg/ml), pero, sensibilidad a bajas concentraciones de meticilina (2-16 µg/ml). Son cepas heterogéneas, pero con tendencia a convertirse a cepas homoresistentes. La expresión de la resistencia eagle-type y la conversión de resistencia heterogénea a resistencia homogénea se cree que es el resultado de un mismo factor genético que es independiente de *SCCmec* y de los factores *fem*. Se realizaron experimentos en los que se extrajeron de la librería genética de este tipo de células dos genes *hmrA* y *hmrB*, las cuales al ser clonadas en cepas sensibles le confirieron a las nuevas cepas la característica de ser eagle type, por lo tanto se cree que estos genes serían responsables de la expresión de este tipo de resistencia (<sup>lxxvii,xcviii</sup>).

#### 3.8.3.5 Pre – Meticilina Resistencia

Las cepas pre-meticilino resistentes son cepas fenotípicamente sensibles pero que, sin embargo, son portadores del gen *mecA*, su comportamiento se debe a una fuerte represión de la transcripción del gen *mecA*, ejercida por el gen *mecI*, que codifica la proteína represora MecI.

Otra característica genética que presentan es que el complejo *mec* de estas cepas está totalmente intacto, es decir no presenta delección ni mutación alguna tanto en *mecA* como en sus reguladores. Estas cepas son clínicamente muy importantes ya que, al ser las bacterias tan vulnerables a mutaciones, una cepa fenotípicamente sensible con estas características genéticas podría convertirse en cualquier momento del tratamiento en una cepa resistente y por lo tanto persistir la patología

### 3.8.4 Factores que afectan el fenotipo de resistencia

Existen otros factores genéticos y ambientales independientes de *SCCmec*, que también tienen influencia en la resistencia a la meticilina (<sup>xcix</sup>,<sup>lx</sup>,<sup>c</sup>,<sup>ci</sup>,<sup>cii</sup>). Estudios de inactivación insercional, han identificado muchos genes estafilocócicos normales, necesarios para la resistencia a la meticilina. Mutaciones en estos factores, llamados *fem* (factor esencial para la resistencia a la meticilina), o *aux* (auxiliares), inhiben la formación de precursores de peptidoglicano (Figura 6). FemA, FemB y FemX, adicionan residuos de glicina en el puente de pentaglicina entre las cadenas de peptidoglicano (<sup>ciii</sup>,<sup>civ</sup>). La amidación del glutamato es inhibida en el péptido principal en los casos donde hay mutación en *femC* (<sup>cv</sup>,<sup>cvi</sup>), la formación de glucosamina -1- fosfato se inhibe en caso de mutación en *femD* (<sup>cvi</sup>) y en mutantes *femF* está bloqueada la formación de precursores en el paso de adición de lisina (<sup>cvi</sup>). Otros factores que podrían influenciar la resistencia a la meticilina son los genes reguladores globales *sar* y *agr* (<sup>cix</sup>).

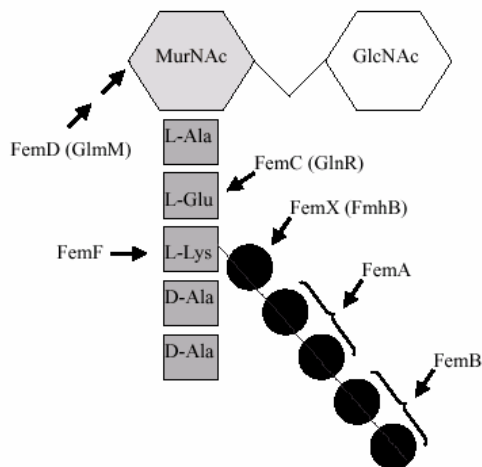


Figura 6. Factores que afectan el ensamblaje del péptido glicano y la resistencia a la meticilina.

### 3.8.5 Prueba de susceptibilidad para MRSA

El diagnóstico primario de resistencia a la metilicina puede ser realizado a través de pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos, recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS<sup>1</sup>). Estos métodos están basados en la difusión de discos de metilicina, preparados comercialmente, los mismos que son colocados en agar; otras pruebas comprenden diluciones seriadas de metilicina, en una base de agar o de caldo (cx, cxi).

Las cepas MRSA heterogéneamente resistentes crecen más lentamente que aquellas cepas homogéneamente resistentes y pueden ser más difíciles de detectar. La adición de NaCl al medio y una temperatura de 35°C durante 48 horas ayuda a la detección.

Sistemas de testeo de susceptibilidad antimicrobiana automatizados son muy usados en Estados Unidos, no así en nuestro medio. Pruebas de aglutinación comercial, basadas en la detección de PBP2a y cajas de agares comerciales con suplementos de metilicina también están disponibles (cxii). Sin embargo el diagnóstico definitivo se logra utilizando la detección del gen *mecA* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (cxiii), hibridización o pruebas de fluorescencia que son vendidas comercialmente.

#### 3.8.5.1 Difusión en Disco

Comprende el uso de una cantidad constante de antimicrobiano, en un disco de papel aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo. Por difusión, se formará un gradiente de concentración del antimicrobiano, y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco. Conforme a los parámetros otorgados por la NCCLS, el valor es comparado con tablas para determinar si la cepa es Sensible o Resistente al antimicrobiano presente en el disco.

Sin embargo, una serie de variables deben estar controladas para lograr un resultado confiable, estos incluyen: espesor del agar, pH y composición, capacidad de difusión de la droga en ese medio, velocidad de duplicación bacteriana, tamaño y fase del inóculo, temperatura y tiempo de lectura. Además, para verificar la ausencia de fallas, debe acompañar controles de referencia correspondientes a cepas conocidas ATCC, que permiten detectar fallas en la carga del disco con antimicrobiano (cxi).

#### 3.8.5.2 Pruebas de Dilución (Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima)

---

<sup>1</sup> NCCLS, actualmente tiene las siglas CLSI (Clinical Laboratory of Standard Institute)

Las técnicas de dilución en caldo o agar, pueden ser utilizadas para medir cuantitativamente la actividad "in Vitro" de un antimicrobiano, frente a un cultivo bacteriano (cx).

Bajo condiciones apropiadas, igual o más del 95% de las cepas resistentes, son detectadas por este método (cxiv). Las últimas recomendaciones de la NCCLS son las de usar caldo Mueller Hinton suplementado con 2% de NaCl y un inóculo de  $5 \times 10^5$  ufc/ml y 24 horas de incubación a 35°C (cx).

Para maximizar la sensibilidad de las cepas meticilina resistentes coagulasa negativas se puede incubar 48 horas antes de decir que una cepa es designada como susceptible (cxv).

### 3.8.5.3 Test de Screening

El test de screening en agar se lo realiza inoculando  $10^4$  ufc en agar Mueller Hinton suplementado con 4% de NaCl y conteniendo 6 µg de Meticilina por ml, luego de 24 horas de incubación a 35°C, debe ser inspeccionado el agar para ver el crecimiento. La presencia de al menos una colonia es indicativo de resistencia (cxxxix).

### 3.8.5.3 Prueba rápida de Aglutinación Slidex MRSA Detection

Es una prueba rápida de aglutinación de partículas de látex, que permite la detección de la Resistencia a la Meticilina en cepas de *Staphylococcus*, mediante detección de PBP2a.

Las partículas de látex, sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal, dirigido contra la PBP2a reaccionan específicamente sobre cepas MRSA provocando aglutinación a simple vista (2).

Tabla 1. Valores referenciales de Sensibilidad y Resistencia a Meticilina para *Staphylococcus* por los métodos de difusión en disco y Concentración Inhibitoria Mínima (Fuente; NCCLS)

	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>		<b><i>Staphylococcus C.N.</i></b>	
	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible
Concentración Inhibitoria Mínima	$\geq 4$ ug/ml	$\leq 2$ ug/ml	$\geq 0,5$ ug/ml	$\leq 0,25$ ug/ml
Difusión en Disco	$\leq 10$ mm	$\geq 13$ mm	$\leq 17$ mm	$\geq 18$ mm

## 3.8.6 Tipificación de MRS

La tipificación a través de métodos fenotípicos o genotípicos tiene por objetivo el definir si un grupo de cepas de una especie es clonal, es decir si surge de un precursor común. Para MRS esta información es necesaria por varios propósitos. En

<sup>2</sup> 2003. Slidex MRSA Detection. BioMerieux® s.a. France

la investigación de brotes, un número incrementado de cepas relacionadas tanto en espacio como en tiempo son tipificadas para determinar si el brote es debido a la difusión de una sola cepa.

Un gran número de métodos han sido desarrollados durante las pasadas décadas, la elección del método de tipificación depende del propósito del análisis, del rendimiento biológico y de la eficiencia técnica de los métodos (cxvi).

La tipificación molecular provee información sobre cambios en la población de MRS, durante largos tiempos de vigilancia, luego de la implementación de medidores de controles de infecciones o luego de cambios en regímenes prescritos de antibióticos. También se lo utiliza para deducir la evolución y la difusión global de cepas MRS.

Un método óptimo para todos los propósitos de tipificación debe mostrar alta reproducibilidad técnica, facilidad de interpretación de resultados. El poder discriminatorio de un método, debe ser alto para investigaciones de brotes, pero menor para estudio de poblaciones (cxvii). La reproducibilidad es particularmente importante si los resultados de la tipificación son guardados, y posteriormente comparados con nuevos resultados.

Los métodos de tipificación fenotípica, caracterizan la relación entre cepas indirectamente a través de la expresión de diferentes genes los resultados son generalmente influenciados por factores ambientales, por lo tanto la identidad o similitud fenotípica no es siempre debido a la identidad genómica y la identidad genómica no siempre se refleja fenotípicamente.

### 3.8.6.1 Tipificación Fenotípica

#### 3.8.6.1.1 Tipificación por Fagos

La fagotipificación es uno de los métodos más antiguos usados para la discriminación de cepas MRSA; el primer grupo de fagos fue establecido hace 50 años (cxviii). La fagotipificación esta basada en la capacidad variable de diferentes bacteriófagos para lisar diferentes cepas de MRS (cxix). Aunque los intentos para establecer grupos de fagos para *S. aureus* y un grupo adicional para MRS, internacionalmente han quedado frustrados. Este método muestra una variación considerable entre laboratorios, ya que requiere experiencia técnica (cxx, cxxi). Sin embargo es un método rápido y suficientemente discriminante para investigaciones de brotes a corto plazo.

#### 3.8.6.1.2 Electroforesis de Multilocus Enzimático (MLEE)

Está basado en la movilidad electroforética de muchas proteínas esenciales para la viabilidad y crecimiento celular (cxxii). Este método no es suficientemente discriminante para investigaciones de brotes, sin embargo provee buena información de estudios de poblaciones.

Otros métodos de tipificación fenotípicos, como biotipificación, serotipificación, electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), análisis de proteínas unidas a la pared celular e "immunoblotting", pueden ser usados como métodos adicionales (cxxxiii, cxxxiv). No obstante estos métodos no son frecuentemente usados, debido a la falta de reproducibilidad y poder de discriminación apropiados

### 3.8.6.2 Tipificación Genotípica

Está basada en el análisis del ADN permitiendo una comparación directa de genotipos entre cepas. El análisis de perfiles plasmídicos o de fragmentos de restricción han sido utilizados en investigaciones de brotes. En estudios de tipificación, aunque el método es técnicamente simple y factible en la mayoría de los laboratorios, su uso es restringido, debido a la variabilidad y su poder discriminatorio.

Los segmentos de tamaños específicos de ADN cromosómico obtenidos mediante el uso de enzimas de restricción y subsecuente electroforesis en geles de agarosa proveen una huella digital discriminante (fingerprint) del cromosoma entero. No obstante, debido al alto número de fragmentos, la interpretación puede ser subjetiva y por lo tanto no reproducible. La interpretación puede ser mejorada haciendo un Southern blotting a los fragmentos de ADN, utilizando una membrana y resaltando grupos de fragmentos con sondas específicas (cxxxv).

Las sondas deben incluir secuencias para áreas conservadas (para proveer tipificabilidad) y variables para retener la discriminación. Preferentemente la secuencia blanco debe ocurrir en múltiples lugares del cromosoma. Las secuencias de ADN que se agrupan dentro de estos criterios en cepas de MRSA incluyen operones de RNA ribosómico, Tn554, IS256 e IS257/S431. La hibridización individual puede ser usada con múltiples sondas, cada una reconociendo una simple copia del gen, como aquellas para la mayoría de los factores de virulencia. Sin embargo este método es mucho más laborioso.

#### 3.8.6.2.1 Métodos de tipificación basados en PCR

Genes específicos con regiones polimórficas repetitivas, como ser los genes *coa* y *spa*, pueden ser usados como blanco para la amplificación por PCR (cxxxvi, cxxxvii). Adicionalmente, la discriminación puede ser conseguida utilizando una técnica de determinación de Polimorfismo basado en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). La amplificación por PCR en regiones repetitivas en tándem de dominios extracelulares de coagulasa estafilocócica, y digestión subsiguiente con Alu I, resultan en una discriminación moderada de las cepas (cxxxiv, cxxxviii).

La variación en las unidades repetitivas de la proteína A son también un blanco para la tipificación, sin embargo, ocurren cambios en las regiones repetitivas de esta proteína más rápidamente que en todo el genoma entero, por lo tanto no es

un blanco conveniente para otros propósitos que no sea la investigación de brotes (cxxxix).

Las secuencias de RNA ribosómico y las secuencias espaciadoras entre el ADNr 23S y 26S han sido también utilizadas como blanco para tipificación por PCR. Otro enfoque, es el uso de secuencias repetitivas polimórficas no codificantes, dispersas alrededor del genoma bacteriano (ERIC o REP) (cxxx).

El PCR con oligonucleótidos aleatorios (AP-PCR), o análisis de polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD), está basado en condiciones poco rigurosas de amplificación, incluyendo el uso de oligonucleótidos cortos. La amplificación de secuencias al azar forma un patrón de PCR, que es compartido por cepas idénticas.

Las condiciones poco rigurosas de PCR pueden reducir la reproducibilidad de este método, y por lo tanto, son rara vez confiables para ensayos de vigilancia epidemiológica, a menos que se tengan disponibles equipos sofisticados, gran habilidad técnica y medios computarizados para guardar e interpretar los datos (cxxx).

#### **3.8.6.2.2 Amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP)**

Es un método de tipificación por PCR recientemente adaptado para la discriminación de bacterias (cxxxii). En este método, el ADN cromosómico es primeramente digerido con cortes frecuentes, y luego adaptadores específicos son unidos a los fragmentos resultantes, y un grupo de estos fragmentos es selectivamente amplificado utilizando oligonucleótidos que reconozcan la secuencia adaptadora y extendiendo el fragmento original por una a tres bases selectivas, el gran número de amplicones marcados con fluorescencia es finalmente separado por electroforesis.

#### **3.8.6.2.3 Tipificación Binaria**

Basada en la hibridación diferencial de más de doce sondas seleccionadas con diferentes cepas de MRSA. Para cada cepa analizada doce resultados "si" o "no" (1 ó 0) son obtenidos (cxxxiii). Las sondas confiables que hibridizan solo con un solo grupo de cepas MRSA, características fueron inicialmente identificadas por RAPD. Con lo que se probó que el método es útil en la caracterización genética de diversidad de clones MRSA, así como en la detección de esparcimiento de un clon de MRSA en naciones enteras (cxxxiv, cxxxv).

#### **3.8.6.2.4 Electroforesis de Campo Pulsante en Gel (PFGE)**

Introducida en 1984 está considerada como el método "standard de oro" para distinguir cepas de MRSA, en este método, el ADN cromosómico es digerido con pocos cortes enzimáticos obteniendo secuencias de reconocimiento de 6 a 8 bases de longitud. La digestión produce largos fragmentos de ADN (20 - 800Kb) que no pueden ser separados en un gel de electroforesis de agarosa convencional. En el PFGE la dirección del campo eléctrico cambia periódicamente, lo cual permite la



separación de fragmentos de ADN de más de 10Mb en tamaño (cxxxvi). La separación está principalmente basada en el tiempo necesario para la reorientación, mayor longitud para mayor volumen que para fragmentos más pequeños, en lugar de la velocidad de migración.

La comparación de secuencias de genomas enteros puede ser el último y más riguroso método para cualquier bacteria. Sin embargo, para los propósitos descritos anteriormente esto no es posible, Es más apropiada la identificación de regiones con secuencias tanto conservadas como variables. El grado de variación dependerá de los propósitos de tipificación.

#### **3.8.6.2.5 Tipificación de Secuencias en Multilocus (MLST)**

Para los análisis de población de MRSA, ha sido usado con éxito el MLST. Está basado en la secuenciación de genes "housekeeping" (genes que codifican proteínas esenciales para los procesos metabólicos). Un número distinto es asignado a cada secuencia diferente del mismo alelo y el perfil alélico de los siete genes define el tipo de cepa (cxxxvii). Aislamientos con tipos de secuencias idénticas son considerados clonales con un alto grado de exactitud (cxvii).

Para investigaciones de brotes, puede ser más conveniente y menos costoso secuenciar un locus discriminatorio como es el caso de las secuencias repetitivas cortas (SSR) en genes *spa* o *coa* (cxxxviii).

El almacenamiento de datos y su interpretación son esenciales, ya que volúmenes masivos de datos, tanto genotípicos, como fenotípicos, pueden ser requeridos, tanto a corto como a largo plazo. Además, la comparación de cepas MRSA entre países, se ha tornado altamente relevante, debido a los esparcimientos pandémicos.

A pesar de los criterios de interpretación establecidos, la disponibilidad de paquetes de software disponibles, y muchas estandarizaciones de PFGE Interlaboratorios (lxxxiv,cxxxviii), la reproducibilidad es muy difícil de alcanzar. Aunque existen programas informáticos que transforman las bandas matemáticamente a valores numéricos, PFGE y otros métodos basados en patrones de bandeo son propensos a sesgos, debido a la selección manual de bandas; por lo tanto, las bases de datos, basados en codificación binaria o secuencias de números o letras, podrían facilitar la comparación de cepas entre países.

## 4 OBJETIVO

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación de los genes implicados en la codificación de PBP2a (PBP2') con la expresión fenotípica de resistencia a la meticilina en cepas de *Staphylococcus spp.*

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el fenotipo de resistencia a la meticilina en cepas de *Staphylococcus spp.*

Determinar la frecuencia del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus spp.*

Determinar la frecuencia de los genes reguladores *mec-R1* y *mec I*

Proponer la frecuencia de tipos de cassettes cromosómicos *mec* en base al juego de oligonucleótidos usados.

Determinar la asociación de la presencia de los genes *mecA*, *mecI* y *mec-R1* con el fenotipo de resistencia a la meticilina

### 4.3 HIPÓTESIS

La expresión fenotípica de la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus spp.* está asociada significativamente con la presencia de los genes de codificación y regulación de PBP2a

# 5 DISEÑO METODOLÓGICO

## 5.1 MUESTRA

Las muestras para este estudio fueron enviadas a partir del segundo semestre del año 2003, desde los Hospitales Obrero, Hospital de Clínicas, Hospital Copacabana y Hospital Arco Iris, de la ciudad de La Paz, así como del Hospital Holandés de la ciudad de El Alto. El procesamiento de las muestras se llevo a cabo en las Unidades de Antimicrobianos y Genética Bacteriana del Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica, del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA), en la ciudad de La Paz.

## 5.2 DEFINICIÓN DE LOS CASOS

Son considerados como casos para este estudio, todas las muestras derivadas al Laboratorio de Bacteriología Clínica, cuyas pruebas bacteriológicas en los laboratorios de los Hospitales participantes hayan resultado positivas para *S. aureus* y *S. coagulasa* negativo.

## 5.3 TOMA DE DATOS

Hojas de registro (Anexos) fueron proporcionadas, con consultas de interés para este estudio, a todos los hospitales participantes, llenados por el personal encargado y enviados junto con las cepas obtenidas de las muestras que procesaron.

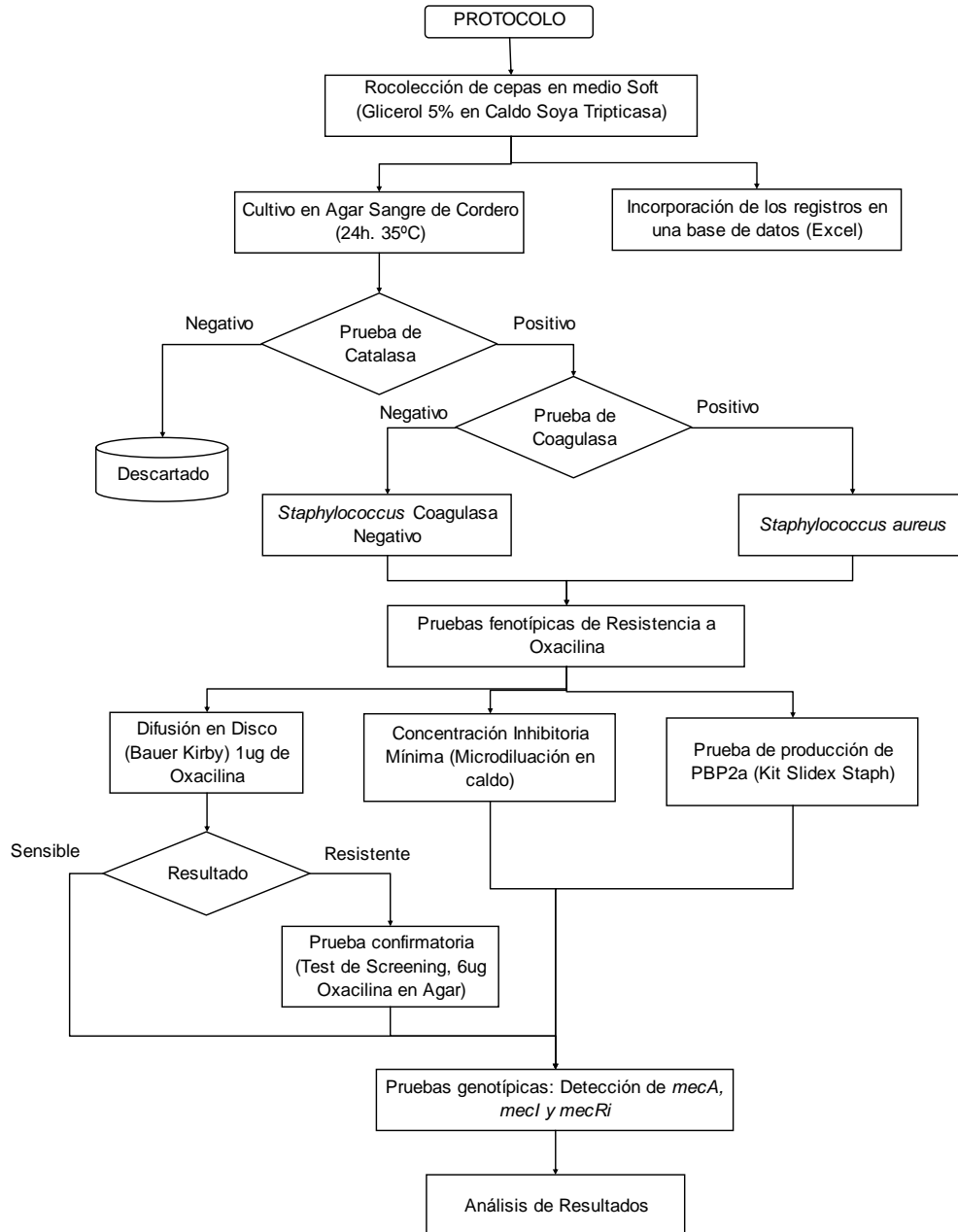
## 5.4 CEPAS BACTERIANAS

Un total de 70 aislamientos fueron recibidos, de los cuales tres fueron desechados debido a contaminación, por lo tanto 67 muestras ingresaron al estudio, las mismas que fueron conservadas en medio con glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$  y luego subcultivadas en agar Soya Tripticasa suplementada con 5 % de sangre de cordero.

De los 67 aislamientos, de acuerdo a criterios estándares de laboratorio, 60 cepas corresponden a *S. aureus* y 7 a *S. coagulasa* negativo. Todas las pruebas fueron realizadas el mismo día, en paralelo, a partir de cultivos puros

Como controles, 3 cepas de referencia fueron incluidas en el estudio: *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC N315 (pre-meticilina resistente) y *S. aureus* ATCC h4 (eagle type), todas *mec A* positivas (Cepas que fueron gentilmente enviadas por el Dr. K.Hiramatsu y T. Ito, del Departamento de Bacteriología de la Universidad de Juntando, Tokio – Japón), una cepa MSSA, *mec A* negativa ATCC 29213 y una cepa de *S. coagulasa* negativo MSSE ATCC 12228 las mismas que fueron utilizadas para estandarizar las condiciones tanto de PCR como de las otras pruebas.

## 5.5 PROCEDIMIENTO



### 5.5.1 Pruebas de Identificación de especie

#### 5.5.1.1 Catalasa

Con una aguja de inoculación transferir parte del centro de una colonia la superficie de un portaobjetos, agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % y observar la formación de burbujas abundantes luego de 30 a 40 segundos .

#### *5.5.1.2 Prueba de coagulasa libre (tubo)*

Emulsificar una pequeña cantidad de la colonia del microorganismo en un tubo que contenga 0,5 ml de plasma, incubar a 35°C durante 4 horas e inclinar el tubo observando si se forma un coágulo, las cepas que no forman coágulo en ese momento, deben ser reincubadas a temperatura ambiente, por 18 horas y nuevamente realizar la lectura.

### **5.5.2 Pruebas fenotípicas de determinación de resistencia**

Todos los procedimientos de determinación de sensibilidad y resistencia, así como valores de referencia se basaron en parámetros establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS<sup>3</sup>).

#### *5.5.2.1 Prueba de difusión de disco en agar (Bauer-Kirby)*

Utilizar discos de 1 µg de metilina (Difco Laboratories, Detroit, MT, USA) colocados en agar Muller Hinton (bioBRAS), con adición de 2% de NaCl. Las zonas de inhibición son determinadas luego de 48 horas de incubación a 35°C. La resistencia a la metilina, es definida de acuerdo a los puntos de corte que da el NCCLS. Los controles incluyen una cepa Metilina resistente (ATCC 43300) y una cepa metilina sensible (ATCC 25923).

#### *5.5.2.2 Prueba de confirmación o test de screening*

Las cepas resistentes (y si hubieran dudosas), son inoculadas en placas de agar Muller Hinton, suplementadas con 4% de NaCl y 6mg de metilina por ml, como lo recomienda el NCCLS; son incubadas a 35 °C por exactamente 24 horas, para confirmar el crecimiento o no de las mismas.

#### *5.5.2.3 Prueba de producción de PBP2a (Slidex MRSA Kit)*

Esta prueba (bioMerieux Vitek, Hazelwood, Mo) es de aglutinación combinada, basada en componentes de látex y hemaglutinación, que detectan coagulasa unida, proteína A y antígenos específicos de pared celular de *Staphylococcus*. Se lo realiza mediante la suspensión de una o dos colonias del microorganismo en una gota de la solución que trae el kit, la aglutinación será leída como positiva .

#### *5.5.2.4 Concentración inhibitoria mínima (CIM)*

La CIM de la metilina (Sigma, St Louis, MO, USA) es determinada por el método de microdilución en caldo, con 2 % de NaCl, luego de 24 horas de incubación a 35 °C, usando 10<sup>5</sup> UFC/ml. La cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus*

---

<sup>3</sup> NCCLS, actualmente tiene las siglas CLSI (Clinical Laboratory of Standard Institute)

Coagulasa Negativos, que son resistentes a la meticilina, presentan valores  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  y  $\geq 0.5\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, de acuerdo a los estándares (NCCLS). Entonces, las concentraciones de meticilina, utilizadas para el estudio comprenden desde 0,25  $\mu\text{g/ml}$  hasta 128  $\mu\text{g/ml}$ .

Los controles utilizados fueron ATCC 43300, cepa N315 (pre-meticilina resistente) y cepa h4 (eagle type). El control negativo de resistencia fue ATCC 29213 (MSSA) y para las cepas coagulasa negativo ATCC 12228 (MSSE).

### 5.5.3 Pruebas Genotípicas para la determinación de resistencia

#### 5.5.3.1 Preparación del ADN cromosómico

Varios experimentos fueron realizados para seleccionar el mejor método de extracción de ADN. Así, fueron establecidos dos métodos:

##### 5.5.3.1.1 Método de extracción por ebullición

Cultivar las cepas de los aislamientos 48 horas antes de la extracción en placas de agar soya tripticasa con 5 % de sangre de cordero. Emulsionar todas las colonias obtenidas de la placa en 2 ml de buffer STE (Anexos), y llevar a ebullición por 5 minutos e inmediatamente después, a congelación a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Centrifugar a 3500 r.p.m. y separar el sobrenadante (donde está el ADN). Para verificar su presencia (ADN) analizar 10  $\mu\text{l}$  del mismo por electroforesis en agarosa al 1,5 %

##### 5.5.3.1.2 Método de extracción con cloroformo

Al igual que el método anterior, emulsionar las colonias obtenidas en 1 ml de buffer STE, llevar a  $88^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto exacto, enfriar con chorro de agua del grifo, añadir 3ml de etanol absoluto, mezclar con micropipeta, congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$  toda la noche (overnight). Centrifugar a 3500 rpm por 15 minutos. Eliminar parcialmente el sobrenadante dejando unos 100  $\mu\text{l}$  en el tubo. Resuspender el precipitado con micropipeta y trasladar a un tubo eppendorf (Descartar el precipitado). Enrasar con etanol hasta 1500 $\mu\text{l}$ , mezclar por inversión 10 veces. Dejar 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Centrifugar a 14000 g por 10 minutos. Eliminar 800  $\mu\text{l}$  de sobrenadante (aspirando con cuidado). Añadir 800  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto frío.

Mezclar por inversión 10 veces. Dejar en reposo a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Centrifugar 10 minutos a 14000 g. Eliminar el sobrenadante, dejando unos 100  $\mu\text{l}$  con el precipitado. Añadir 600  $\mu\text{l}$  de STE, añadir 600  $\mu\text{l}$  de cloroformo. Agitar con vortex hasta emulsión completa. Dejar 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm. Llevar el sobrenadante a un tubo nuevo, aspirando toda la fase acuosa posible (no importa arrastrar algo de cloroformo). Añadir 600  $\mu\text{l}$  de cloroformo al tubo nuevo y agitar con vortex hasta emulsión completa. Dejar en reposo 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Centrifugar 10 minutos a 14000 g. Llevar la fase acuosa con el

máximo cuidado posible a un tubo nuevo (tener extremo cuidado de no arrastrar cloroformo. No importa dejar 100 µl de fase acuosa).

Enrrasar hasta 1500 µl con etanol absoluto sobre el tubo con la fase acuosa. Mezclar por inversión 10 veces, gentilmente. Dejar la muestra a -70°C por una hora. Centrifugar 10 minutos a 14000 g. Eliminar el sobrenadante, dejando unos 500 µl con el precipitado. Dejar a -20°C por 20 minutos.

Centrifugar 10 minutos a 14000 g. Eliminar el sobrenadante lentamente hasta dejar unos 100 µl. Con la tapa abierta llevar el tubo eppendorf a evaporación del etanol remante en una estufa a 70°C hasta que esté seco. Añadir 35 µl de Agua tridestilada. Dejar a 18°C (Temperatura ambiente) por 10 minutos. Agitar con vórtex 20 segundos. Centrifugar fugazmente (Spindown). Guardar el ADN a -70°C para conservación, o 4°C para utilizar hasta 5 días.

#### 5.5.3.2 Condiciones de PCR

El ADN extraído es utilizado para la amplificación de los segmentos de interés, por PCR, en un volumen final de 20 µl, consistente en buffer de PCR 1X (1,5mM de MgCl<sub>2</sub>); 0,25mM de cada desoxinucleotido trifosfato, 0,8 µM de cada oligonucleotido (Tabla 2, Figura 7), 0,05 UI/µl de Taq DNA polimerasa (Promega corporation, Madison, WI, USA).

La amplificación es realizada en un termociclador (Px2 Thermo electrocorporation), utilizando el programa siguiente: desnaturalización inicial a 94°C 4 minutos, 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C 1 minuto, hibridación a 58°C para *mecA*, y 55°C para los genes reguladores, 1 minuto, extensión a 72 °C 2 minutos y una extensión final a 72 °C 4 minutos.

Una muestra de 20 µl de cada reacción fue analizada por electroforesis en gel de agarosa (SIGMA EC No. 232-731-8) al 1,5 % con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular fue utilizado DNA Ladder 100pb (invitrogene)

Tabla 2. Oligonucleótidos para PCR utilizados para detectar los genes *mecA*, *mecI* y *mecR1*. PB: dominio de unión a la penicilina; MS: región transmembrana de *mecR1*

Oligonucleótido	Secuencia	Posición del nucleótido	Tamaño del Amplicon (bp)
<b><i>mecA</i></b>			
p1	5'GGTCCCATTA ACTCTGAAG 3'	911 – 929	535
p2i	5' GCCAACCTTTACCATCGAT 3'	1427 – 1445	
p3	5' AGTTCTGCAGTACCGGATTG 3'	1956 – 1935	
<b><i>mecI</i></b>			
SA9	5' AATGGCGAAAAAGCACAACA 3'	1923 – 1942	481
SA10	5' GACTTGATTGTTTCCTCTGTT 3'	2403-2383	
<b><i>mecR1</i></b>			
SA14	5' GTCGTTTCATTAGATATGACG 3'	666 – 646	310 (MS)
SA13	5' GTCTCCACGTTAATTCCATT 3'	357 – 376	1598 (PB)
SA17	5' CGCTCAGAAATTTGTTGTGC 3'	1954-1935	

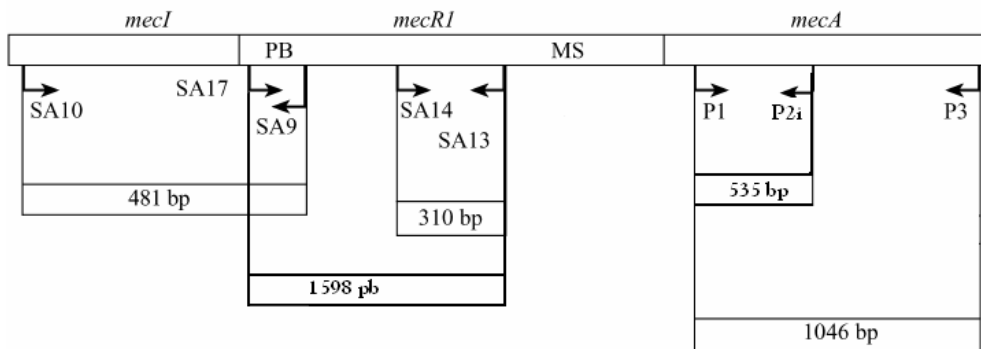


Figura 7. Representación esquemática de la organización genómica de la región *mec*. Las flechas indican la dirección de los oligonucleótidos usados. Los tamaños de los productos de PCR están incluidos. PB: dominio de unión a la penicilina; MS: región transmembrana de *mecR1*



## 6 RESULTADOS

Las cepas recibidas por el INLASA, procedentes de los cinco centros de salud (Hospital Obrero, Hospital de Clínicas, Hospital Arco Iris, Hospital Copacabana y Hospital Boliviano Holandés) Con el reporte diagnóstico de *S. aureus* y *S.C.N.*, fueron confirmadas utilizando los procedimientos estándares de detección de *Staphylococcus*.

Los resultados pueden ser apreciados en la Tabla 2. Sobre 67 cepas estudiadas, 60 efectivamente, corresponden a *S. aureus*; 7 corresponden a *Staphylococcus* C.N. (Concordancia del 90%)

Tabla 3. Relación de especies de *Staphylococcus* detectadas en los centros de Salud, con respecto a la confirmación efectuada en el laboratorio del INLASA

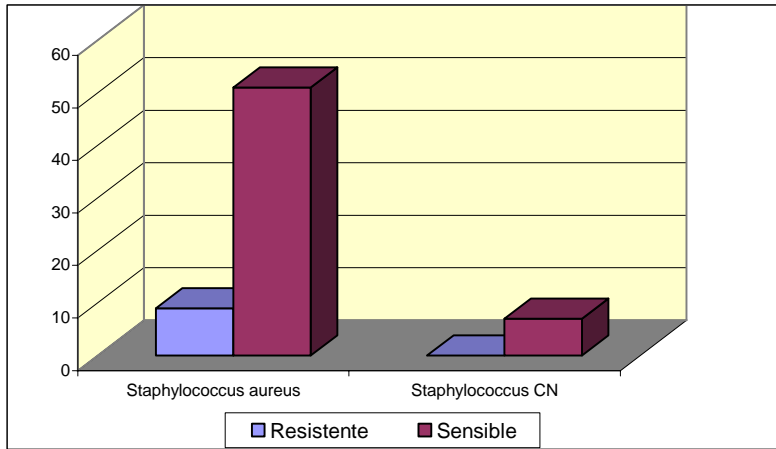
Especie detectada en laboratorio del Hospital		Confirmación en Laboratorio de INLASA		Total
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> CN	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	58	
<i>Staphylococcus</i> CN	2	2	4	
total	60	7	67	

### 6.1 FENOTIPO DE RESISTENCIA A LA METICILINA

Cuatro técnicas fueron aplicadas para la determinación de este fenotipo: Difusión en disco (Bauer Kirby), Prueba de confirmación (Meticilina en agar, 6 µg/ml), la prueba de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Prueba de detección de cepas productoras de PBP2a (Kit Slidex MRSA).

Los resultados de difusión en disco (Gráfica 1), presentan 9 cepas de *S.aureus* resistentes, de 60 totales. Y todas las cepas C.N. sensibles.

En la Tabla 4, es posible apreciar los resultados tanto por difusión en disco confrontados con los de Concentración Inhibitoria Mínima. Así, de las 9 cepas resistentes por difusión en Disco, 1 de ellas tiene un resultado discordante (Sensible) por CIM. Además, aparecen 7 cepas resistentes por CIM, que eran Sensibles por Difusión en Disco. Por último, las 7 cepas sensibles de *Staphylococcus* Coagulasa Negativo, son resistentes por CIM.



Especie	Sensibilidad		Total
	Resistente	Sensible	
Staphylococcus aureus	9	51	60
Staphylococcus CN	0	7	7
<i>total</i>	9	58	67

Test exacto de Fisher 0.345742204

Gráfica 1. Sensibilidad y Resistencia a la Meticilina en cepas de *S. aureus* y *S. Coagulasa Negativo*. Método de Difusión en Disco (Bauer Kirby)

La Tabla 5 nos permite comparar un tercer método de determinación de Sensibilidad y resistencia: el kit Slidex MRSA, basado en la detección de la proteína PBP2a por aglutinación. Los resultados de esta prueba son discordantes con la prueba de Difusión en Disco en un 20% (14/67) y con la prueba CIM en un 34% (23/67)

Tabla 4. Comparación de los resultados de Sensibilidad y Resistencia de cepas de *Staphylococcus*, entre los métodos de Difusión en Disco y Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Difusión en disco		CIM				total
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus CN</i>		
		Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	
Resistente	8	1	0	0	9	
Sensible	7	44	7	0	58	
<i>total</i>	15	45	7	0	67	

Tabla 5. Comparación de los resultados de Sensibilidad y Resistencia de cepas de *Staphylococcus* entre tres métodos: Difusión en Disco, kit Slidex MRSA y Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Método Difusión en disco	Resistente	Método Slidex	Resistente	CIM				total
				<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus CN</i>		
				Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	
	Resistente	Método Slidex	Resistente	6	0	0	0	6
			Sensible	2	1	0	0	3
	Sensible	Método Slidex	Resistente	1	9	1	0	11
			Sensible	6	35	6	0	47
Total				15	45	7	0	67

## 6.2 DETERMINACION DE LOS GENOTIPOS RELACIONADOS CON RESISTENCIA A LA METICILINA

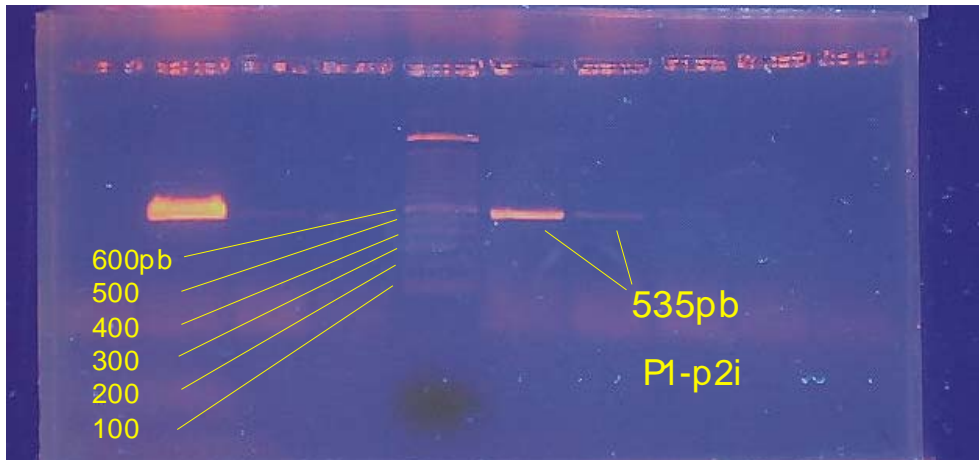
Tabla 6. Detección de dos segmentos del gen *mecA*, mediante el uso de dos pares de oligonucleótidos (p1-p3 y p1-p2i, respectivamente)

P1 - P3

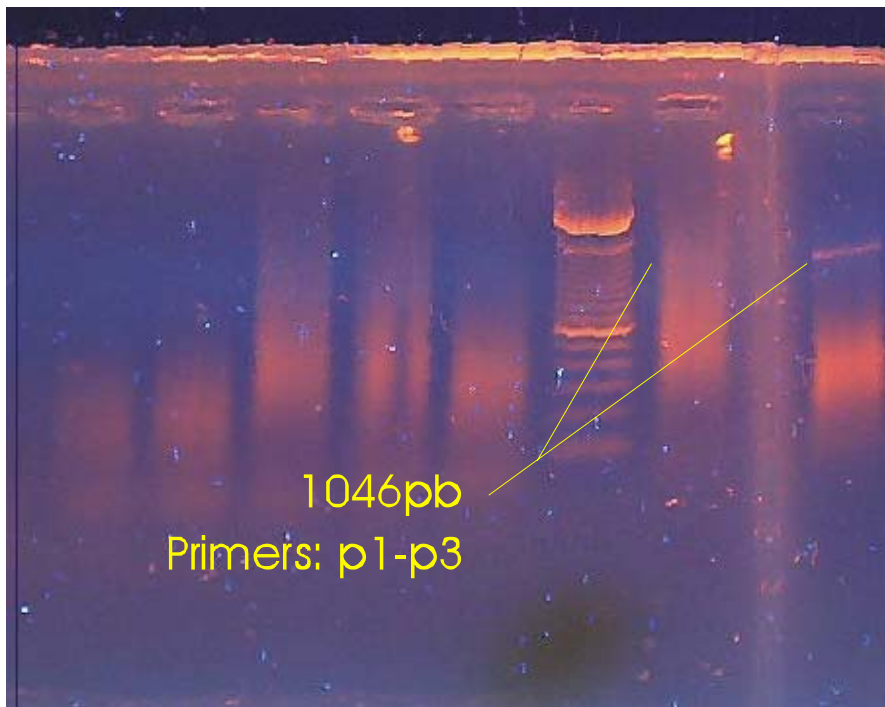
P1 P2i	Staphylococcus aureus		Staphylococcus CN		total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
	Positivo	3	5	1	
Negativo	2	50	0	3	55
Total	5	55	1	6	67

Test exacto de Fisher 0.0084

De 60 cepas de *Staphylococcus aureus*, 10 (17%) son portadoras del gen *mecA*, detectados con al menos un par de oligonucleótidos, de los dos utilizados. De todas las cepas *mecA* positivas, 3 (30%) no tuvieron alteraciones en su secuencia, puesto que la combinación p1-p2i dio un producto amplificado de 535 pares de bases (Fotografía 1), y con la combinación p1-p3 dio el producto de 1046pb (Fotografía 2).



Fotografía 1. Amplificación de un segmento de *mecA* mediante el uso de par p1-p2i. Un marcador de Número de bases (Ladder 100bp) fue utilizado. Fuente: INLASA-LNRBC



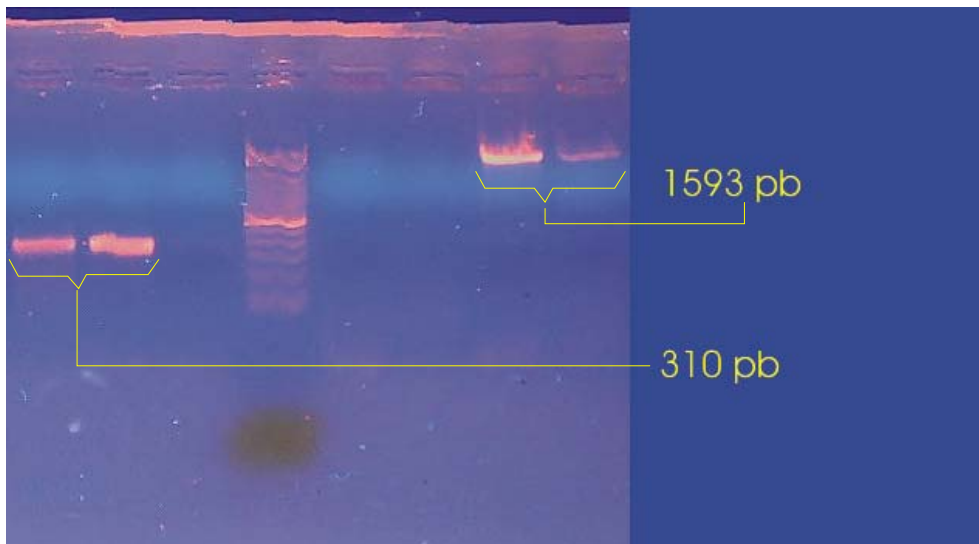
Fotografía 2. Amplificación de un segmento de *mecA*, mediante el uso del par de oligonucleótidos p1-p3. También fue incluido un marcador de Número de pares de bases. Fuente: INLASA – LNRBC.

De las 10 cepas *mecA* positivas, 5 (50%) presentaron alteraciones en su secuencia al dar producto con los pares p1-p2i, pero no con el par p1-p3. Dos cepas (20%) presentaron alteración en su secuencia por ocurrir lo inverso (p1-p3 negativo). Así, en total, 7 cepas (70%) son portadoras del gen *mecA* alterado en su secuencia.

De 7 cepas de *Staphylococcus Coagulasa Negativos*, 4 (57%) tenían en su cromosoma el gen *mecA*. De estas, sólo una (14%) portaba el gen intacto, mientras que tres (43%) presentaron alteraciones en su secuencia, en este caso, no dieron producto de amplificación con el par p1-p3 (Tabla 6).

Para la detección de los genes reguladores *mecI* y *mecR1*, fueron usados cinco oligonucleótidos, combinados en tres pares (Figura 7).

La fracción que codifica la región Transmembrana (MS) de *mecR1* fue detectada por el par SA14-SA13. La fracción de Unión a la Penicilina (PB), fue detectada por el par SA17-SA13 (Fotografía 3).



Fotografía 3. Productos de la amplificación de las dos regiones del gen *mecR1*: 310 pb para la región MS y 1593 pb para la región PB.

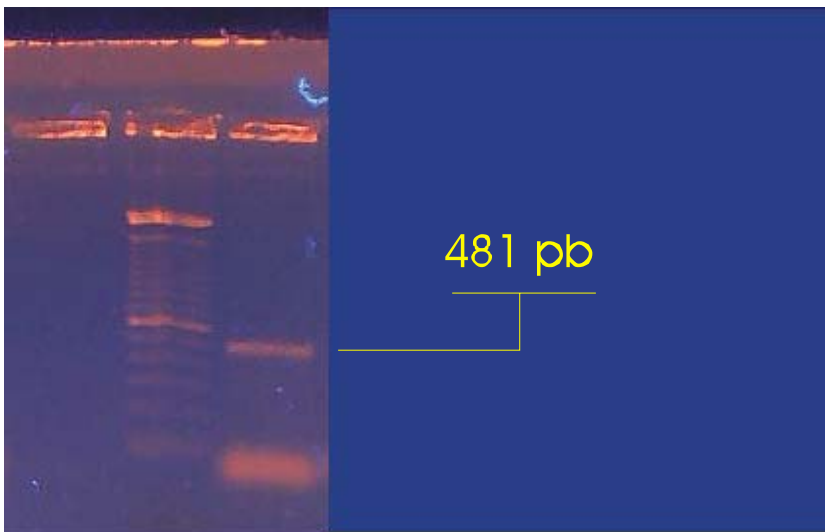
Los resultados para el gen *mecR1*, pueden ser apreciados en la Tabla 7. De las 10 cepas *mecA* positivas de *Staphylococcus aureus*, 5 son portadoras del gen *mecR1*, de estas, 3 poseen el gen intacto y 2 tienen el gen alterado, ya que no dieron producto de amplificación sobre la región PB, pero sí sobre la región MS.

Tabla 7. Detección de las regiones PB y MS del gen *mecR1*, de cepas de *Staphylococcus* portadoras del gen *mecA*.

		Región PB				total
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus</i> CN		
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Región MS	Positivo	3	2	0	1	6
	Negativo	0	5	1	2	8
total		3	7	1	3	14

Test exacto de Fisher                      0.1875

De las 4 cepas *mecA* positivas de *Staphylococcus* Coagulasa Negativo, 2 portan el gen *mecR1*. De estas, ambas poseen alteraciones en diferentes puntos de su secuencia, pues una cepa tuvo producto de amplificación sobre la región PB pero no sobre la región MS, y la otra cepa dio resultado a la inversa de la primera.



Fotografía 4. Producto de amplificación del gen *mecI* (481 pb)

Para la detección del gen *mecI* el producto de amplificación obtenido alcanza un tamaño de 481 pares de bases (Fotografía 4).

De las 10 cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras del gen *mecA*, 7 (70%) presentan el gen *mecI*. Por otro lado, de las 4 cepas de *Staphylococcus* Coagulasa Negativo, 2 (50%), portan el gen *mecI* (Tabla 8).

Tabla 8. Presencia del gen *mecl* en cepas de *Staphylococcus* portadoras del gen *mecA*

		Gen <i>mecl</i>		Total
		Presente	Ausente	
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	10
	<i>Staphylococcus</i> CN	2	2	4
total		9	5	14

Test exacto de Fisher 0.454545

### 6.3 TIPOS DE CASSETTES CROMOSÓMICOS

Tabla 9. Frecuencia de los diferentes tipos de cassettes cromosómicos *mec*, en base a los productos amplificados con el juego de oligonucleótidos (SA17, SA13, SA14, SA10 y SA9) en cepas de *Staphylococcus* portadoras del gen *mecA*.

#### *Staphylococcus aureus*

Cassette	SA17	SA14	SA13	SA10	SA9	Cepas
I o IV	ausente	presente	presente	ausente	ausente	1
II	presente	presente	presente	presente	presente	3
III	presente	presente	ausente	presente	presente	3
Var I	ausente	presente	presente	presente	presente	1
Var II	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	2
Total cepas:						10

#### *Staphylococcus* Coagulasa Negativo

Cassette	SA17	SA14	SA13	SA10	SA9	Cepas
I o IV	ausente	presente	presente	ausente	ausente	1
II	presente	presente	presente	presente	presente	0
III	presente	presente	ausente	presente	presente	1
Var II	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	1
Var III	presente	ausente	presente	presente	presente	1
Total cepas						4

mecRI pb	SA17-SA13	Par de primers para detectar la región PB de <i>mecR1</i>
mecR1 MS	SA14-SA13	Par de primers para detectar la región MS de <i>mecR1</i>
mecl	SA10-SA9	Par de primers para detectar <i>mecl</i>

Var = Variante ( No coincidente con los tipos conocidos)

La Tabla 9 presenta la frecuencia de los diferentes cassettes cromosómicos *mec* obtenidos en base al juego de oligonucleótidos utilizados para la detección de *mecR1* y *mecl*.

Es importante tomar en cuenta que esta apreciación no es definitiva, ya que los cassettes tienen otros indicadores que también requieren ser detectados para confirmar el tipo.

Como es posible apreciar, el juego de oligonucleótidos no tiene suficiente poder para diferenciar el casete tipo I del tipo IV, por lo tanto, la presencia de una cepa de *S. aureus* y otra de *S. C. N.*, podrían ser portadoras ya sea del tipo I o del IV.

3 cepas de *S. aureus* podrían ser portadoras del cassette tipo II; pero ninguna de *S. C. N.*

3 cepas de *S. aureus* podrían ser portadoras del tipo III, y una cepa de *S. C. N.*

3 cepas de *S. aureus*, y 2 de *S. C. N.*, no coinciden con ninguno de los 4 tipos conocidos.



## 6.4 RELACION DE LA RESISTENCIA A LA METICILINA POR CIM CON LA PRESENCIA DE LOS GENES *MECA*, *MECR1* Y *MECI*

Tabla 10. Presencia de los genes *mecR1* y *mecI* de cepas de *Staphylococcus mecA* positivas, asociadas al fenotipo de resistencia y sensibilidad a la Meticilina (p1-p3: primers orientados sobre la secuencia completa del gen *mecA*; p1-p2i: primers orientados sobre un segmento de *mecA*; SA9-SA10: primers orientados sobre el gen *mecI*; SA13-SA14: sobre el segmento central de MS de *mecR1*; SA13-SA17: sobre el segmento PB del gen *mecR1*)

								SA13 - SA14							
								Positivo SA9 - SA10		Negativo SA9 - SA10		Positivo SA9 - SA10		Negativo SA9 - SA10	
								P1 - P3		P1 - P3		P1 - P3		P1 - P3	
								Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM	RESISTENTE	SA13 - SA17	Positivo	P1-P2i	Positivo	1	0							
				Negativo	P1-P2i	Negativo	1	0							
		SENSIBLE	SA13 - SA17	Positivo	P1-P2i	Positivo	0	1		0	2				
				Negativo	P1-P2i	Negativo	0	0		0	0				
	CIM	RESISTENTE	SA13 - SA17	Positivo	P1-P2i	Positivo	1	0							
				Negativo	P1-P2i	Negativo	0	0							
		SENSIBLE	SA13 - SA17	Positivo	P1-P2i	Positivo			1	0	0	0			
				Negativo	P1-P2i	Negativo			0	0	1	0	2		
<i>Staphylococcus CN</i>	CIM	RESISTENTE	SA13 - SA17	Positivo	P1-P2i	Positivo				1	0				
				Negativo	P1-P2i	Negativo			0	0	0	0			
		SENSIBLE	SA13 - SA17	Positivo	P1-P2i	Positivo			0	1	0	1			
				Negativo	P1-P2i	Negativo			0	0	0	0			

Cassette tipo		Var	
<span style="color: blue;">■</span>	I o IV	<span style="color: red;">■</span>	Var 1
<span style="color: orange;">■</span>	II	<span style="color: black;">■</span>	Var II
<span style="color: magenta;">■</span>	III	<span style="color: green;">■</span>	Var III

Var = Variante (no coincidente con los tipos conocidos)

De las 5 cepas de *Staphylococcus aureus*, resistentes a meticilina por el método CIM, una es portadora del gen *mecA* intacto, *mecR1* intacto, y *mecI*. Otra cepa, porta el gen *mecA* alterado (no da producto de amplificación con el primer p2i, en el centro del gen), pero es portadora de los genes *mecI* y *mecR1*. Una cepa, posee el gen *mecA* alterado (no amplifica con el primer P3), también tiene el gen *mecR1* alterado ( la región PB no dio producto), pero posee el gen *mecI*. Y dos cepas, tienen el gen *mecA* alterado (no amplifican con el primer P3), poseen el gen *mecI*, y es negativo para el gen *mecR1*.

De las 5 cepas de *Staphylococcus aureus*, sensibles a Meticilina, una es portadora del gen *mecA*, *mecI* y *mecR1* intactos. Una cepa tiene el gen *mecA* intacto, no

presenta *mecl*, y el *mecR1* está alterado (no amplifica con el primer SA17, es decir, región PB). Una Cepa tiene el gen *mecA* alterado (no amplifica con P2i), no posee el gen *mecR1*, pero si el gen *mecl*. Por último, dos cepas poseen el gen *mecA* alterado (no amplifica con el primer p3) y no posee los genes reguladores (*mecl* y *mecR1*)

Todas las cepas (cuatro) de *Staphylococcus* Coagulasa Negativo, portadoras del gen *mecA* son resistentes a Meticilina. Entonces, de estas, una es portadora del gen *mecA* intacto, portadora de *mecl*, y también de *mecR1* alterado (no amplifica con SA14, es decir, la región MS). Una cepa tiene el *mecA* alterado (no amplifica con p3), *mecR1* presente, pero alterado (no amplifica la región PB) y *mecl* está ausente. Una cepa tiene *mecA* alterado en p3, no presenta *mecR1*, pero si *mecl*. Finalmente, una cepa portadora de *mecA* alterado (no amplifica en p3), no posee *mecR1*, tampoco *mecl*.

## 7 DISCUSIONES

El principio de un buen resultado es una buena práctica. Así, no sólo es importante determinar la resistencia o sensibilidad de una cepa, en este caso, *Staphylococcus*, sino, previamente, haberla identificado correctamente. De ahí la necesidad de realizar la confirmación de los resultados obtenidos por los centros de salud participantes. Estas apreciaciones toman cuerpo, al observar la Tabla 3, en la cual podemos verificar una concordancia sólo del 90 %, ya que de las 63 cepas reportadas como *S. aureus*, 5 corresponden a C. N., y de las 4 reportadas como C.N., en realidad sólo 2 lo son. Tomando en cuenta sólo los C.N. la discordancia es del 50%

Este tipo de errores afectaría dramáticamente en el reporte de sensibilidad y resistencia, ya que los puntos de corte son diferentes para ambos grupos (Tabla 1). Esto repercutiría epidemiológicamente, dando lugar a información errada.

El efecto de este error sobre el paciente, también es relevante, porque el médico tomará una decisión acertada, por su criterio profesional, pero errada, por causa del reporte laboratorial.

### 7.1 FENOTIPOS DE RESISTENCIA A METICILINA

Aunque el método de difusión en disco es ampliamente utilizado en los laboratorios, para el género *Staphylococcus*, es el menos confiable para la determinación de resistencia a la meticilina <sup>(cxxxix, cxl, cxli)</sup>, ya que tiene baja capacidad de detección de cepas resistentes comparado con otros métodos.

Los esfuerzos para incrementar la sensibilidad de esta prueba con adición de NaCl al agar, o la incubación por 48 horas reduce la especificidad, particularmente para *S. aureus*. De todos modos, incubaciones más largas pueden mejorar la sensibilidad para la detección de cepas heterogéneas de *Staphylococcus* Coagulasa negativos, sin afectar apreciablemente la especificidad (i).

Entonces, de acuerdo a las normas de la NCCLS, la lectura debe realizarse a las 48 horas, y esta podría ser la explicación del hallazgo de una cepa de *S. aureus* sensible por CIM entre las 9 resistentes por Difusión en Disco debido a la disminución de la sensibilidad (Tabla 4).

Pero algo más significativo todavía, es la detección de 7 cepas de S.C.N., resistentes por CIM, que fueron sensibles por Difusión en Disco, debido a la baja Especificidad de esta prueba. Este hallazgo coincide con los resultados de otros estudios, en los cuales afirman que los métodos convencionales a menudo tienen dificultades para detectar cepas resistentes a Meticilina <sup>(cxlii)</sup>

El método del kit Slidex MRSA, aplicado para la detección de la proteína PBP2a no está validado por la NCCLS (clvii). Sin embargo, existen reportes del uso del mismo, que muestran resultados óptimos (cxliii, cxliiv). No obstante en nuestra práctica, los resultados del Slidex MRSA fueron los más discordantes entre los tres métodos.

El problema en este método radica en la característica de *Staphylococcus* de presentar cepas heterogéneas respecto a la resistencia a la meticilina. Algunas cepas Meticilina resistentes, no expresarán la proteína PBP2a sin previa estimulación (cepas eagle type), y serán reportados como Falsos Negativos.

Otras, que presentan resistencia a la Meticilina por hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas, no relacionadas con la producción de PBP2a, serán reportadas también como Falsos Negativos.

La presencia de nueve casos Resistentes por este método, pero sensibles por Difusión en Disco y CIM (Tabla 5), indicarían la presencia de la proteína PBP2a que no logra alcanzar una concentración suficiente para que pueda ser detectada por los otros dos métodos (reconocidos por la NCCLS). Esta apreciación está respaldada por investigaciones realizadas al respecto (cxlvii). También planteamos como hipótesis, la presencia de aglutinación por reacción cruzada con proteínas similares a PBP2a por lo menos a nivel de epítopes.

Si esta hipótesis es válida, demostraría que el método Slidex MRSA no es confiable.

## **7.2 GENOTIPOS DE RESISTENCIA A LA METICILINA**

De acuerdo a normas internacionales (cxi), la detección del gen *mecA*, al margen de cualquier resultado fenotípico con Antimicrobianos, debe ser reportado como "Meticilina resistente". Entonces la expresión fenotípica, no es tan determinante como la genotípica. Incluso, la detección de *mecA*, es considerada como la prueba "Gold Standard" para la resistencia a Meticilina.

Comparando con otros estudios (cxliv, cxlvi), la frecuencia de cepas portadoras del gen *mecA*, es baja (17%). No obstante, este resultado no es reconfortante, puesto que los reportes sobre vigilancia epidemiológica en Bolivia (x) por métodos fenotípicos determinan un incremento entre los años 1999 y 2000 (de 3% a 6.9%, respectivamente).

En lo referente a las cepas Coagulasa Negativas, la tasa de cepas portadoras de *mecA* es mayor (57%)

Estudios realizados en otros países, encuentran la secuencia del gen *mecA* altamente conservada, alcanzando valores de hasta 89% en *Staphylococcus aureus* y 94.7% en *S. Coagulasa negativos*. Sin embargo, este estudio, realizado sobre cepas bolivianas, halla una baja tasa de conservación de la secuencia del gen *mecA* (30% en *S. aureus* y 25% en *S. C. N.*). Esto probablemente se debe al

tamaño de muestra insuficiente para determinar la confiabilidad del resultado. De todas maneras, el hallazgo de 10 cepas portadoras de *mecA*, de las cuales sólo 3 tienen el gen intacto es llamativo.

Si este resultado fuera significativo, indicaría que la secuencia no está lo suficientemente protegida de los diversos factores que llevan a la alteración de la secuencia. Además, la presencia de alteraciones no está dirigida a un solo punto, sino a dos (podiera ser a mas lugares de la secuencia) ¿Qué tan beneficioso es para la clínica este hallazgo? Esto será tratado más adelante al relacionarla con el fenotipo.

Respecto a la presencia del gen regulador positivo *mecR1*, y del gen regulador negativo *mecl*, en las cepas de *Staphylococcus aureus* y *S. C. N.*, *mecA* positivas, su importancia está enfocada a la asociación con el tipo de cassette que podrían poseer. Y por otra parte, a la asociación con el fenotipo de resistencia.

Los tipos de cassettes propuestos en la Tabla 9 no son concluyentes, debido a que estos son islas cromosómicas constituidas por varios elementos acompañantes, tales como transposones, genes de resistencia, el complejo *ccr*, que es un conjunto de recombinasas, encargadas de la integración del cassette, así como de su escisión. Así, son necesarios más instrumentos moleculares que permitan una clara y definitiva diferenciación de los tipos (lxvii, lxix, cxlvii, cxlviii).

### **7.3 ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO CON EL FENOTIPO DE RESISTENCIA A METICILINA**

Desarrollaremos la discusión considerando cada cepa a color en base al orden de aparición en la Tabla 10.

#### **7.3.1 *Staphylococcus aureus***

La primera cepa (color rojo) es portadora de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecl*. Dio productos de amplificación con todos los pares de oligonucleótidos. Fenotípicamente es Resistente por el método de Concentración Inhibitoria Mínima (128 µg/ml), de igual manera por Difusión en Disco. De acuerdo a los productos de amplificación, esta cepa sería portadora del cassette cromosómico tipo II.

La cepa corresponde a un aislamiento de una muestra de infección de tipo comunitaria.

En la prueba de CIM, la cepa fue sensible a bajas concentraciones, pero Resistente a 128 µg/ml, lo cual es una característica de las cepas "Eagle type". Entonces, esta cepa debe portar en su cromosoma los genes *hmrA* y *hmrB*, que no están demostrados en este estudio (cxlix).

La segunda cepa (color rojo); portadora de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecl*; con la característica de presentar una alteración en el gen *mecA*, pues no hubo amplificación con el oligonucleótido p2i, que está ubicado en la región central de *mecA*. No obstante, esta cepa es resistente por CIM (128 µg/ml, Eagle type). En difusión por Disco, fue resistente. Corresponde al cassette tipo II.

La alteración presente en *mecA*, no es significativa clínicamente, es decir, no afecta a la expresión efectiva de PBP2a (y su correspondiente Resistencia de Meticilina). La cepa, es de origen intrahospitalario

La tercera cepa (color rojo); portadora del cassette tipo II, posee todos los genes intactos. Sin embargo, es sensible por difusión en Disco y por CIM (2µg/ml). Esta es la característica de una cepa Pre – metilina resistente. En este caso, esta cepa no portaría los genes *hmrA* y *hmrB* (cxlix).

La cuarta cepa (color café); es portadora del gen *mecA*, alterado en el sitio de unión con el oligonucleótido P3. *mecR1* está presente pero con una mutación a nivel del oligonucleótido SA17, de la región PB. *mecl* está presente. Por CIM y por Difusión en Disco esta cepa es Resistente (128 µg/ml por CIM, cepa Eagle type). El fenotipo revela que, aunque *mecR1* está alterado, esta alteración no es significativa. Lo mismo acontece con el gen *mecA*.

El conjunto de los productos amplificados no coincide con ninguno de los cuatro tipos descritos en la bibliografía (Ixix,xiii,lxvii). Esto podría indicar la presencia de un cassette como una nueva variante, puesto que a la fecha han sido descritas otras variantes de estos cassettes (cl).

La muestra es de origen comunitario.

La quinta y sexta cepas (color fucsia), son portadoras del cassette tipo III. El gen *mecA* está alterado a nivel del oligonucleótido P3, no obstante, esta cepa es resistente por CIM (4 µg/ml tipo BORSA y 128 µg/ml eagle type, respectivamente).

Es necesario resaltar el hecho, que, de acuerdo con los resultados de laboratorio, el gen *mecR1* podría estar ausente, puesto que el juego de tres oligonucleótidos no dio ningún producto de amplificación. Sin embargo, este gen es bastante grande, de tal modo que, hay una porción que no fue analizada en este estudio, que podría estar presente, indicando así su presencia.

Una cosa es cierta, el gen *mecR1* es un regulador positivo, es decir activa la expresión de *mecA* a PBP2a. Ahora, una de las cepas es BORSA (CIM=4), y conforme a la bibliografía, generalmente estas son productoras de β-lactamasas, antes que productoras de PBP2a(i). Además, la presencia del gen *mecl*, detectado en ambas cepas, explica la fuerte represión para la expresión de *mecA*.

En cuanto a la cepa con CIM = 128, conforme al fenotipo observado, corresponde a una Eagle type. En este caso, el gen *mecR1* está activo. Una prueba de su presencia, puede ser la detección misma del gen *mecI*, ya que uno de los oligonucleótidos (SA9, Figura 7) corresponde a un sector del gen *mecRI*. En este caso, pese a las mutaciones presentes en *mecR1*, la actividad de su producto continúa con la capacidad de estimular la expresión de *mecA*.

De igual manera ocurre con el gen *mecA*, que presenta alteración en su secuencia, al no dar producto de amplificación con el oligonucleótido P3. Esta alteración no es significativa, y la producción de PBP2a es eficiente.

Por otra parte, esta cepa además debe poseer los genes *hmrA* y *hmrB*, que permiten presentar un fenotipo "Eagle type".

Ambas cepas, son de origen intrahospitalario.

La séptima cepa (color azul), portadora del cassette tipo I o IV (no es posible diferenciarlos con el juego de oligonucleótidos usados en este estudio), posee el gen *mecA* intacto, *mecR1* está alterado a nivel de la región PB, y *mecI* estaría ausente. Esta cepa es sensible por CIM (1 µg/ml) y por Difusión en Disco.

Si bien el gen *mecA* está presente, su expresión es mínima o nula; posiblemente porque la alteración a nivel de la región PB de *mecRI*, estaría afectando de manera significativa la expresión de su proteína, especialmente en el dominio correspondiente a la unión con la Penicilina. De esta manera, no hay estímulo para la expresión de *mecA*. Además, el elemento supresor de la codificación de penicilinasas (*blaI*), estaría presente, reprimiendo la expresión de *mecA*, que está bajo un control dual, tanto de *mecRI-mecI* y *blaR1-blaI* (c<sup>li</sup>, lxxix).

Aunque no hay seguridad del tipo de cassette al que pertenece (I o IV), la probabilidad que sea el tipo IV es mayor, dado que esta cepa es de origen comunitario (c<sup>lii</sup>), según estudios en Francia y Japón.

La Octava cepa (color fucsia), posee el cassette cromosómico tipo III. El gen *mecA* está alterado a nivel del sitio de unión con el oligonucleótido P2i. El gen *mecI* está presente, sin embargo, el gen *mecRI* estaría ausente. Esta cepa es sensible por CIM (2 µg/ml) y por Difusión en disco. Es de origen comunitario.

La sensibilidad fenotípica observada, puede obedecer a dos posibles causas: La primera: el gen *mecA* tiene una alteración significativa, lo cual no permite la codificación a PBP2a, o el producto es ineficiente. La segunda: *mecI*, al estar presente, está ejerciendo una fuerte represión de *mecA*.

No obstante este resultado, esta cepa no dejaría de ser una "pre-meticilina resistente", ya que, la estimulación de *mecA*, no solo puede darse gracias a *mecR1*,

sino también por *blaR1*, y en algún momento del tratamiento, in vivo, desencadenarse la resistencia. In vivo la probabilidad de que este cambio fenotípico ocurra es mucho más alto que in vitro, debido al elevado número de cepas presentes en una infección, donde puede ocurrir la transferencia de ADN entre cepas, o la mutación de estos genes.

La Novena y décima cepas (color negro): Debido a las características que presentan estas cepas, no es posible agruparlas dentro de alguno de los tipos específicos de cassettes conocidos. Más bien parecerían ser una variante. Ambas presentan el *mecA*, con alteración a nivel de P3. Los genes reguladores parecen estar ausentes. El fenotipo que presentan, tanto por CIM (1 y 2 µg/ml, respectivamente), como por Difusión en Disco, es Sensible. Las cepas son de origen intrahospitalario.

La causa del fenotipo sensible en estas cepas puede deberse a la necesidad de *mecA*, de un regulador como *mecR1*, que al estar ausente, no puede codificar PBP2a. Esto también indicaría la ausencia de *blaR1*, que hubiera reemplazado a *mecR1*.

Hubieron además, cepas *mecA* negativas, pero con fenotipo resistente (10/60, 17%) sobre el total de las cepas de *S. aureus* estudiadas. Los valores de CIM de estas cepas fueron BORSA; hecho que, corrobora la ausencia de *mecA*, por lo cual, la posibilidad del fenotipo resistente apunta a la presencia de β-lactamasas (i)

### 7.3.2 *Staphylococcus* Coagulasa Negativo

Todas las cepas tienen un fenotipo Resistente.

La primera cepa (color verde), parece no pertenecer a ninguno de los cuatro cassettes conocidos, constituyéndose en una posible nueva variante. Todos los productos de amplificación fueron obtenidos, excepto la correspondiente a la región MS de *mecR1*. La CIM de esta cepa fue de 2 µg/ml. Este es un valor que obedece a una expresión débil de *mecA*. Esta cepa es Sensible por el método de Difusión en Disco. Así que, aparentemente, la resistencia detectada por CIM parece deberse a la presencia de β-lactamasas. Dada la alteración observada en *mecR1*, es posible que *mecA* no esté siendo expresado por la represión ejercida por *mecI*, presente e intacto. Esta cepa es de origen comunitario.

La segunda cepa (color azul), posee ya sea el cassette tipo I o IV. El gen *mecA* está alterado a nivel de P3. El gen *mecI*, está deletado. El gen *mecR1* está alterado a nivel de la región PB. El fenotipo de esta cepa es Resistente por CIM (4 µg/ml), y sensible por Difusión en Disco. De igual manera que el anterior caso, la Resistencia observada no es alta, como ocurre cuando *mecA* está siendo expresado. La resistencia es tan sutil, que el método de Difusión en disco no la puede detectar.



Genéticamente no habría represión de *mecA*, por la ausencia de *mecI*. Pero la expresión de *mecA*, dependiente de *mecR1*, tiene a este regulador alterado, posiblemente de manera significativa. Entonces, el fenotipo resistente por CIM, apunta más a la presencia de  $\beta$ -lactamasas (cxlix,cli). Esta cepa es de tipo comunitario, lo que inclina a pensar que posiblemente es portadora del cassette tipo IV, más que del tipo I(cli).

La tercera cepa (color fucsia), posee el cassette tipo III. El gen *mecA* está alterado a nivel de P3. El gen *mecR1* no dio producto de amplificación en ninguna de las dos regiones (PB y MS). El gen *mecI* está presente. El fenotipo es Resistente por CIM (1  $\mu$ g/ml), y sensible por Difusión en Disco. Con esta cepa acontece lo mismo que con las anteriores. La Resistencia débil parece ser efecto de  $\beta$ -lactamasas, antes que la producción de PBP2a. Esta cepa es de origen intrahospitalario.

La última cepa (color negro), posee otra variante de cassette, diferente a las variantes antes mencionadas. Todos los productos de amplificación fueron negativos, excepto para la región PB de *mecA*. El fenotipo es Resistente por CIM (0.5  $\mu$ g/ml), y sensible por Difusión en Disco. Nuevamente, este comportamiento fenotípico, apunta a que la resistencia se debe a la presencia de  $\beta$ -lactamasas.

Entre las 7 cepas totales de *S. C. N.*, 2 fueron *mecA* negativas, pero con fenotipo resistente por CIM y sensible por Difusión en disco. La resistencia detectada correspondería a la presencia de  $\beta$ -lactamasas, para estas cepas (i).

## 8 CONCLUSIONES

Definitivamente, existen problemas en la diferenciación de cepas de *Staphylococcus aureus* con respecto a las cepas de *S. Coagulasa Negativo*. Esto conduce a un error en la interpretación de los resultados cuando es aplicado el método clásico de Difusión en Disco, y por el método CIM, que es más específico aún, puesto que los puntos de corte son diferentes para ambos grupos.

Por otra parte, existen fuertes discordancias entre los resultados de sensibilidad por CIM y por Difusión en Disco. Pero entre ambos, el CIM es más confiable, porque permite identificar características más finas, tales como la concentración a la cual la cepa es inhibida, si se trata de una "Borderline", o es una "Eagle Type", o una "homorresistente".

La presencia del gen *mecA* es importante (10/60). Aunque este valor es inferior a los reportados en otros países (ciii,xii,cxlv), es alarmante para la población y merece atención efectiva. La presencia de este gen es determinante para la decisión clínica. En este estudio, de las 10 cepas portadoras de *mecA*, 5 presentaron fenotipo resistente. Las cinco restantes, son cepas con alta capacidad de "convertirse" en resistentes "in vivo", porque solo requieren mutaciones para activar la expresión del gen, sin embargo, serán reportadas como "sensibles", por los métodos clásicos.

La detección de *mecA*, no puede efectuarse mediante pruebas fenotípicas, como se puede evidenciar en este estudio. Es necesaria la aplicación de técnicas moleculares que identifiquen al gen directamente. Como otros autores sugieren, la detección de *mecA*, debería ser considerada como "Gold Standard" para la decisión final de los médicos (i,cx,cxi).

Prácticamente todas las cepas resistentes *mecA* positivas presentaron un comportamiento "Eagle type". Esto indica que el único método fenotípico para detectarlas es mediante CIM. Estas cepas son héterorresistentes, y, aunque fueron resistentes por Difusión en Disco, por tratarse de un método cualitativo, existe alto riesgo de confundirlas con cepas sensibles (i).

De las 10 cepas de *S. aureus mecA* positivas, 7 poseen el gen *mecA* alterado. Y de las cinco con fenotipo resistente por CIM, sólo una tiene el gen intacto. Esto revela la alta tasa de mutación que tiene este segmento cromosómico, y que según este estudio no es significativo en la mayoría de los casos. En otras palabras, no es necesario el gen intacto para la expresión de PBP2a, parece ser suficiente su presencia.

La presencia de *mecI*, en siete de las diez cepas *mecA* positivas de *S. aureus*, también demuestra alta variabilidad. Pero es importante hacer notar que todas las

cepas resistentes, portan este gen. Su presencia, entonces confirma el comportamiento "Eagle Type" observado en estas cepas, dándonos la pauta que *hmrA* y *hmrB* deben estar presentes para superar a *mecI* en la expresión de *mecA*.

La presencia de *mecR1*, en el 50% de las cepas de *S. aureus*, parece no ser determinante para la expresión de la resistencia por producción de PBP2a, puesto que entre las resistentes, 2 de 5 no presentan este gen. Si pese a la ausencia de este regulador positivo, la expresión de *mecA* es posible, nos indica que hay genes alternativos que reemplazan a *mecR1*. Efectivamente, *blaR1* es el gen que puede activar a *mecA* (lxxix).

En cuanto a los tipos de cassettes propuestos, es importante indicar que esta clasificación no es concluyente, porque nos basamos en los sitios de complementariedad de los oligonucleótidos. Pero los cassettes son mucho más grandes que sólo el complejo *mec* (lxix).

No obstante, parece ser que las cepas son portadoras de cualquiera de los tipos de cassettes, sin haber predominio significativo de ninguno sobre los demás, aclarando, que parecen estar presentes tres nuevas variantes que no coinciden con los tipos descritos (cl).

Con respecto a las cepas de *Staphylococcus* Coagulasa Negativos, aunque algunas poseen el gen *mecA*, parece ser que no juega un rol importante; más bien, la producción de  $\beta$ -lactamasas podría ser el factor principal para la presencia de resistencia.

Finalmente, luego del análisis de los resultados obtenidos, podemos concluir que no existe asociación entre el fenotipo de Sensibilidad y Resistencia, y la presencia de los genes implicados en la codificación de PBP2a. Hecho que estaría refutando la hipótesis planteada en este estudio, en la que se afirma que La expresión fenotípica de la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus spp* está asociada significativamente con la presencia de los genes de codificación y regulación de PBP2a. Sin embargo, como se pudo evidenciar, la resistencia a la meticilina obedece a múltiples factores que los métodos fenotípicos clásicos no pueden englobar.

La exploración genética de los *Staphylococcus* de mayor número de cepas , permitirá encontrar mayor diversidad a nivel de *SCCmec* , que aclarará , cómo, las distintas especies de *Staphylococcus* intercambian la información genética, relacionada con la multiresistencia a antibióticos , así como la presión selectiva del ambiente y su influencia fenotípica y genotípica.

## 9 COMENTARIOS

Las fallas referentes a la diferenciación de *Staphylococcus* con respecto a la especie *aureus* con los Coagulasa Negativo, implica las técnicas aplicadas para la diferenciación con la prueba de Coagulasa, que, aunque es la prueba Gold Standard, el procedimiento puede ser fácilmente equivocado. Un resultado negativo, a las cuatro horas, requiere ser leído nuevamente a las 24 para su confirmación. Las pruebas más fieles se realizan en tubo, y no en placa como ocurre en la mayoría de los laboratorios que efectúan esta técnica.

Por otro lado, existe la posibilidad de que algunas cepas Coagulasa Negativas, sean *Staphylococcus aureus* como ocurriría en algunas cepas <sup>(cliv, clv)</sup>. Asimismo, hay falsos positivos, referido a cepas No *S.aureus*, que producen proteasas, llamadas pseudocoagulasas, que podrían formar coágulo <sup>(clvi)</sup>.

El uso de discos con  $\beta$ -lactámicos que no son Oxacilina o Meticilina, especialmente las cefalosporinas, no es recomendado, debido a que reduce a la larga la exactitud del test.

Actualmente, en el método de difusión en disco, el Antimicrobiano preferido para analizar la resistencia de *Staphylococcus* Coagulasa Negativos, es la Cefoxitina, aunque los criterios interpretativos de la Meticilina para S.C.N. se correlacionan con la presencia o ausencia del gen *mecA* en *S. epidermidis*, estos criterios interpretativos podrían falsamente llamar Resistente a otros C.N., como ser, *S. saprophyticus*. Las pruebas con discos de cefoxitina, tienen mayor especificidad e igual sensibilidad que las pruebas con discos de Meticilina para S.C.N. <sup>(clvii)</sup>

Si bien, algunas cepas de S.C.N., no son clínicamente importantes, es decir estas por el tipo de muestra de la cual provienen no serían patógenos potenciales, se las tomo en cuenta debido a que al constituirse SCC*mec* en un elemento móvil, existe clara evidencia de que ocurre transferencia horizontal de este elemento de una cepa no patógena portadora de *mec* (que en este caso podría tratarse de una coagulasa negativa) a otra cepa que si bien no portaría *mec*, sería la que esta causando la enfermedad, por lo tanto, una vez adquirido el gen *mec*, su comportamiento en cuanto a la respuesta al antibiótico que se esta usando para erradicarlo, podría cambiar en el curso del tratamiento

Algo interesante de resaltar, es el hecho de que, actualmente se esta tomando ventaja de la ingenieria genética para realizar la manipulación de ciertos genes y sus propiedades , como es el caso de *SCCmec* , que al ser un elemento movil que le confiere resistencia, es susceptible de ser removido del cromosoma bacteriano y como consecuencia una cepa resistente se convertiría en sensible, dicho tipo de manipulaciones, son relativamente fáciles de realizar in Vitro, el problema radica en realizarlo in vivo, el llegar a concretar esta meta, llevaría a pensar en el desarrollo de una terapia génica alternativa al uso de antibióticos, hecho que sería crucial, especialmente para aquellos patógenos problema que expresan multiresistencia .

# 10 BIBLIOGRAFÍA

- 
- i Chambers,H.F.1997.Methicillin resistance in Staphylococci:molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microb Rev 10:781-91
- ii Tomasz, A., Dugeon, H., de Lancastre,D.1989. New mechanism for methicillin resistance in Staphylococcus aureus: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicilin binding capacity. Antimicrob Agent Chemother 33:1869-74.
- iii Kuroda, M.,Tohta,I. Uchiyama,T.,et al 2001.Whole genoma sequencing of methicilin-resistant Staphylococcus aureus .Lancet 357:1225-40.
- iv Geyid,A.;and Y. Lemeneh.1991.The incidence of methicilin resistant S. aureus strains in clinical specimens in relation to their beta-lactamase producing and multiple drug resistance properties in Addis Abeba.Ethiop Med J 29:149-61
- v Panlilio,A.L.,D.H.Culver,R.P.Gaynes,et al .1992.Methicilin resitant S.aureus in U.S. hospitals,1975-12991.Infect Control Hosp Epidemiol 13:582-6.
- vi Witte,W.,M.Kresken, C.Braukle, and C.Cuny.1997.Increasing incidence and widespred dissemination of methicilin - resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals.Clin Microbiol Infect 3:414-422.
- vii Turnidge,J.D., and J.M. Bell.2000. Methicilin resistant Staphylococcus aureus evolution in Australia over 35 years. Microb Drug Resist 6:233-9.
- viii Mehndirrata,P.L., S. Vidhani, and M.D. Mathur. 2001. A study on Staphylococcus aureus strains submitted to a reference laboratory. Indian J med Res 114:90-4.
- ix Organización Panamericana de la Salud (OPS) . 1999. Fármaco Resistencia a Antimicrobianos: panorama regional, datos por microorganismo y por país.
- x Ministerio de Salud y Previsión Social, Instituto de Laboratorios en Salud. Laboratorio Nacional de Referencia Bacteriología Clínica. 2001. Vigilancia Epidemiológica de Resistencia a los Antimicrobianos (VERA) ,1999-2000. Boletín Informativo
- xi MA, X.X.,T. Ito,C.Tiensasitor,et al.2002. Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Identified in Community-Acquired Methicilin-Strains.Antimicrob Agents Chemother 46:1147-52.
- xii Oliveira D.,Tomasz A.,de Lancastre H.2001The evolution of pandemin clonesof methicillin resistant Staphylococcus aureus : identification of two ancestral genetic background and associated mec elements. Microb Drug Resist 7:349-61.

- 
- xiii Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu. 2000. A new class of genetic element, *staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicilin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemoter* 44:1549-55.
- xiv Sharma, V.K., C.J. Hackbrth, A.ta.Ama.Adaickinson, and G.L. Archer. 1998. Interaction of native and mutant Mec I repressor with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicilin resistant staphylococci. *J Bacteriol* 180:2160-6
- xv Tesch, W., C. Ryffel, A. Strassle, F.H. Kayser, and B. Berger- achi. 1990. Evidence of a novel staphylococcal *mec*-encoded element (*mecR*) controlling expression of penicillin binding protein 2'. *Antimicrob Agents Chemoter* 34:1703-6
- xvi Couto L., de Lancastre H., Severina E., et al. 1996 Ubiquitous presence of a *mecA* presence homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Res* 2:377-391
- xvii Archer G.L. and Niemeyer D.M. 1994. Origen and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol* 2:343-347
- xviii Franklin D. Lowy. 1998. *Staphylococcus aureus* infectious. *New England Journal of medicine* 339:520-32.
- xix Jáuregui Peredo L. E. 2002. *Antimicrobianos: Uso Terapéutico en Infectología Clínica*. Editorial Plural. Primera Edición. 81-85.
- xx Anconan R.J., Ferrieri P., Williams P.P. 1980. Maternal Factors that enhance the acquisition of group B streptococci by newborn infants. *J. Med. Microbiol.* 13:273-280.
- xxi Bair R.W., Bronze M.S., Kraus W. et al. 1991. Epitopes of group A streptococcal M proteins shared with antigens of articular cartilage and synovium. *J. Immunol.* 146:3132-3137.
- xxii Boulnois G.L. 1992. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen Microbiol.* 138:249-259.
- xxiii Bouvet A. 1995. Human endocarditis due to nutritionally variant streptococci: *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus*. *Eur Heart.* 16:24-27.
- xxiv Ember J.A., Hugli T.E. 1989. Characterization of the human neutrophil response to sex pheromones from *Streptococcus faecalis*. *Am. J. Pathol.* 134:797-805
- xxv Fertally S.S. Facklam R. 1987. Comparison of physiologic tests used used to identify non-beta-hemolytic aerococci, enterococci, and streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 25:1845-1850.
- xxvi Hassan-King M, Baldeh I, Secka O. et al. 1994. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:1721-1724.
- xxvii Reviglione M.C., Tierno P.M., Ottuso P. et al. 1990. Group G streptococcal meningitis and sepsis in patient with AIDS. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13:261-264

- 
- <sup>xxviii</sup> Peacock, S. J., Justice, A., Griffiths, D., de Silva, G. D. I., Kantzanou, M. N., Crook, D., Sleeman, K., Day, N. P. J. 2003. Determinants of Acquisition and Carriage of *Staphylococcus aureus* in Infancy. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5718-5725.
- <sup>xxix</sup> Makoto Kuroda et al. Whole genome sequencing of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2001. *Lancet.* 357: 1227.
- <sup>xxx</sup> Diep, B. A., Perdreau-Remington, F., Sensabaugh, G. F. 2003. Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* by Multilocus Restriction Fragment Typing, a Rapid Screening Approach for Molecular Epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4559-4564
- <sup>xxxi</sup> Jin, T., Bokarewa, M., McIntyre, L., Tarkowski, A., Corey, G. R., Reller, L. B., Fowler, V. G. Jr 2003. Fatal outcome of bacteraemic patients caused by infection with staphylokinase-deficient *Staphylococcus aureus* strains. *J. Med. Microbiol.* 52: 919-923
- <sup>xxxii</sup> Kuklin, N. A., Pancari, G. D., Tobery, T. W., Cope, L., Jackson, J., Gill, C., Overbye, K., Francis, K. P., Yu, J., Montgomery, D., Anderson, A. S., McClements, W., Jansen, K. U. 2003. Real-Time Monitoring of Bacterial Infection In Vivo: Development of Bioluminescent Staphylococcal Foreign-Body and Deep-Thigh-Wound Mouse Infection Models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2740-2748
- <sup>xxxiii</sup> Naimi, T. S., LeDell, K. H., Como-Sabetti, K., Borchardt, S. M., Boxrud, D. J., Etienne, J., Johnson, S. K., Vandenesch, F., Fridkin, S., O'Boyle, C., Danila, R. N., Lynfield, R. 2003. Comparison of Community- and Health Care-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *JAMA* 290: 2976-2984.
- <sup>xxxiv</sup> Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R., Dell'Acqua, G., Gov, Y., Kamysz, W., Lukasiak, J., Mocchegiani, F., Orlando, F., D'Amato, G., Balaban, N., Saba, V., Scalise, G. 2003. Prophylactic Efficacy of Topical Temporin A and RNAIII-Inhibiting Peptide in a Subcutaneous Rat Pouch Model of Graft Infection Attributable to Staphylococci With Intermediate Resistance to Glycopeptides. *Circulation* 108: 767-771.
- <sup>xxxv</sup> Sterba, K. M., Mackintosh, S. G., Blevins, J. S., Hurlburt, B. K., Smeltzer, M. S. 2003. Characterization of *Staphylococcus aureus* SarA Binding Sites. *J. Bacteriol.* 185: 4410-4417
- <sup>xxxvi</sup> Levi, K., Bailey, C., Bennett, A., Marsh, P., Cardy, D. L. N., Towner, K. J. 2003. Evaluation of an Isothermal Signal Amplification Method for Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patient-Screening Swabs. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3187-3191.
- <sup>xxxvii</sup> Waldvogel, F.A. 2000. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock), p.2069-2092. In G. Mandell, J. Bennett y R. Dolin (ed.), *Principles and practice of infectious diseases*, vol. 2. Churchill Livingstone Philadelphia.
- <sup>xxxviii</sup> Ladhani, S., C.L. Joannou, D.P. Lochrie, R. W. Evans y S.M. Poston. 1999. Clinical, Microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxin causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:224-242.
- <sup>xxxix</sup> Holmberg, S.D. y P.A. Blake. 1984. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *Jama* 251:487-9.



- 
- xi Wieneke, A.A., D. Roberts y R.J Gilbert. 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol. Infect.* 110:519-31.
- xii Dinges, M.M., P. Orwin y P.M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13:16-34, table of contents.
- xiii Shands, K.N., G.P. Schmid, B.B. Dan, D. Blum, R.J. Guidotti, N.T. Hargrett, R.L. Aderson, D.L. Hill, C.V. Broome, J.D. Band y D.W. Fraser. 1980. Toxic-shock syndrome in menstruating women: association with tampon use and *Staphylococcus aureus* and clinical feature in 52 cases. *N. Engl. J. Med.* 303: 1436-42.
- xiiii Todd, J., M. Fishaut, F. Kapral y T. Welch. 1978. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I *Staphylococci*. *Lancet* 2:1116-8.
- xlv Mardh P.A. 1984. *Staphylococcus saprophyticus* as a common cause of urinary tract infections. *Rev. Infect. Dis.* 6:328-337.
- xlv Li, R., Manna, A. C., Dai, S., Cheung, A. L., Zhang, G. 2003. Crystal Structure of the SarS Protein from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 185: 4219-4225.
- xlvi Baumgart S., Hall S.E., Campos J.M. et al. 1983. Sepsis with coagulase-negative cocci in critically ill newborns. *Am J. Dis. Child.* 137:461-463.
- xlvii Bergan T., Kocur M. 1982. *Stomatococcus mucilaginosus* gen. Nov., sp nov., emend. Rev., a member of the family Micrococcaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:374-377.
- xlviii Bergan T., Kocur M. 1986. *Stomatococcus*. In Sneath PHA Nair NS, Holt JG (eds), *Berge's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, pp 1008-1010. Baltimore, Williams & Wilkins
- xlix Bergdoll M.S., Reiser R.F., Crass B.A. et al. 1981. A new staphylococcal enterotoxin F, associated with toxic shocks syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* 1: 1017-1021.
- I Bergdoll M.S., Schlievert P.M. 1984. Toxic shock syndrome toxic. *Lancet* 2:691.
- ii Koneman Elmer, et al. 2001. *Diagnóstico Clínico*. Editorial médica PANAMERICANA. Quinta Edición. Buenos Aires, Argentina.
- iii Berke A., Tilton R.C. 1986. Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 23:916-919.
- iiii Brakstad. O.G., K. Aasbakk y J.A. Maeland. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J. Clin. Microbiol.* 30:1654-1660.
- liv McDougal, L.K. y C. Thornsberry. 1986. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.* 23:832-9.
- lv Tomasz, A., H.B. Drugeon, H.M. De Lencastre, D. Jabes, L. McDougall y J. Bille. 1989. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical

---

isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob. Agents Chemother* 33:1869-74.

lvi Brown, D.F. y P.E. Reynolds. 1980. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 122:275-8.

lvii Reynold, P.E. 1986. Methicillin-resistant strain *Staphylococcus aureus*; presence of identical additional penicillin-binding protein in all strain examined. *FEMS Microbiology Letters* 32:251-254.

lviii Ubukata, K., N. Yamashita y M. Konno. 1985. Occurrence of a beta-lactamen-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 24:851-7.

lix Song, M.D., M. Wachi, M. Doi, F. Ishino y M. Matsuhashi. 1987. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett* 221:167-71.

lx Chambers, H.F. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:781-91.

lxi Pinho, M.G., A.M. Ludovice, S. Wu y H. de Lencastre. 1997. Massive reduction in methicillin resistance by transposon inactivation of the normal PBP2 in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* 3:409-13.

lxii Pinho, M.G., H. de Lencastre y A. Tomasz. 2001. An acquired and native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10886-91.

lxiii Hiramatsu, K., N. Konodo y T. Ito. 1996. Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. *J. Infect. Chemother.* 2:117-129.

lxiv Kuhl, S.A., P.A. Patee y J.N. Baldwin. 1978. Chromosomal map location of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 135:460-5.

lxv Patel, A.H., T.J. Foster y P.A. Pattee. 1989. Physical and genetic mapping of the protein A gene in the chromosome of *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Gen Microbiol.* 135:1799-807.

lxvi Beck, W.D., B. Berger-Bachi y F.H. Kayser. 1986. Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of *mec*-specific DNA. *J. Bacteriol.* 165:373-8.

lxvii Katayama, Y., T. Ito y K. Hiramatsu. 2000. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agent Chemother* 44:1549-55.

lxviii Matthews, P.R., K.C. Redd y P.R. Steward. 1987. The cloning of chromosomal DNA associated with methicillin and other resistances in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen Microbiol.* 133:1919-29.

- 
- lxi Ito, T., Y. Katamaya, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn y K. Hiramatsu. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 45:1323-36.
- lxx Ma, X.X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle-Vavra, R.S. Daum y K. Hiramatsu. 2002. Novel type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain. *Antimicrob. Agents Chemother* 46:1147-52.
- lxxi Oliveira, D.C., A. Tomasz y H. de Lencastre. 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* element. *Microb. Drug Resist.* 7:349-61
- lxxii Kuwahara-Ari, K., N. Kondo, S. Hori, E. Tateda-Suzuki y K. Hiramatsu. 1996. Suppression of methicillin resistance in *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP 2' production. *Antimicrob. Agents Chemother* 40:2680-5.
- lxxiii Sharma, V.K., C.J. Hackbarth, T.M. Dickson y G.L. Archer. 1998. Interaction of negative and mutant *MecI* repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J. Bacteriol.* 180:2160-6.
- lxxiv Marples, A., G. Balistreri, E. Tonoli, E.A. Debía y G.C. Schito. 2000. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolates in a large Italian hospital. *J. Clin Microbiol.* 38:866-869.
- lxxv Hiramatsu, K. 1995. Molecular evolution of MRSA. *Microbiol. Immunol.* 39:531-43.
- lxxvi Matthews, P. y P. Steward. 1984. Resistance heterogeneity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 22:161-166.
- lxxvii Ryffel, C., A. Strassle, F.H. Kayser y B. Berger-Bachi. 1994. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 38:724-8.
- lxxviii Papakyriacou, H., D. Vaz, A. Simor, M. Louie y M.J. McGavin. 2000. Molecular analysis of the accessory gene regulator (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 181:990-1000.
- lxxix Hackbarth, C.J. y H.F. Chambers. 1993. *blaI* and *blaRI* regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 37:1144-9.
- lxxx Kobayashi, N., K. Taniguchi y S. Urasawa. 1998. Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agent. Chemother* 42:717-20.

- 
- lxxxix Suzuki, E., K. Kuwahara-Arai, J.F. Richardson y K. Hiramatsu. 1993. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother* 37:1219-26.
- lxxxii Jevons, M. 1961. Celbenin - resistant staphylococci. *British Medical Journal* 1:124-125.
- lxxxiii Couto, L., H. De Lencastre, E. Severina, W. Loos, J.A. Webster, R.J. Hubner, I.S. Sanches y A. Tomasz. 1996. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resist.* 2:377-91.
- lxxxiv Chung, M., H. de Lencastre, P. Matthews, A. Tomasz, I. Adamsson, M. et al. 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of result obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strain. *Microb. Drug Resist.* 6:189-198.
- lxxxv Wu, S., C. Piscitelli, H. de Lencastre y A. Tomasz. 1996. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resist.* 2:435-41.
- lxxxvi Lacey, R.W. y J. Grinstead. 1973. Genetic analysis of methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*; evidence for their evolution from a single clone. *J. Med. Microbiol.* 6:511-26.
- lxxxvii Kreiswirth, B., J. Kornblum, R.D. Arbeit, W. Eisner, J.N. Maslow, A. McGeer, D.E. Low y R.P. Novick. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 259:227-30.
- lxxxviii Musser, J.M. y V. Kapur. 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain from intercontinental sources: association of *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J. Clin. Microbiol.* 30:2058-63.
- lxxxix Fitzgerald, J.R., D.E. Sturdevant, S.M. Mackie, S.R. Gill y J.M. Musser. 2001. Evolutionary of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strain and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8821-6.
- xc Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Marumaya, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N.K. Takahashi, T. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Kattori, N. Ogasawara, H. Hayashi y K. Hiramatsu. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357:1225-40.
- xci Hartman, B.J. y A. Tomasz. 1986. Expresión of methicillin resistance in heterogeneous strain of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:85-92.
- xcii Matthews, P.R. y P.R. Stewart. 1998. Resistance heterogeneity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22:161-166.

- 
- xciii Gerberding, J.L., C. Miick, Il. F. Lin y Il. F. Chambers. 1991. Comparison of conventional susceptibility test with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.. Agents Chemother.* 35:2574-2579.
- xciv Tomasz, A., Il. B. Drugeon, Il. M. de Lencastre, D. Jabes, L. McDongal y J. Bille. 1989. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1874-1899.
- xcv Ryffel, C., A. Strassle, F. H. Kayser y Berger-Bachi. 1994. Mechanism of heteroresistance in methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agent Chemother.* 38:724-728.
- xcvi Kondo, N., K. Kuwahara-Arai, H. Kuroda-Murakami, E. Tateda-Suzuki y K. Hiramatsu. 2001. Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under mec regulator gene control. *Antimicrob. Agent Chemother* 45:815-24.
- xcvii Berger-Bachi, B. 1999. Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci* 56:764-70.
- xcviii Kondo, N., K. Kuwahara-Arai, H. Kuroda-Murakami, E. Tateda-Suzuki y K. Hiramatsu. 2001. Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under mec regulator gene control. *Antimicrob. Agent Chemother* 45:815-24.
- xcix Berger-Bachi, B. 1999. Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol. Life Sci* 56:764-70.
- c de Lencastre, H. y A. Tomasz. 1994. Reassessment of the number of auxiliary genes assential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 38:2590-8.
- ci de Lencastre H., S.W. Wu, M.G. Pinho, A.M. Ludovice, S. Filipe, S. Gardete, R. Sobral, S. Gill, M. Chung y A. Tomasz. 1999. Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. *Microb. Drug. Resist.* 5:163-75.
- cii Sabath, L.D. 1977. Chemical and physical factors influencing methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 3:47-51.
- ciii Rohrer, S., K. Ehler, M Tschierske, H. Labischinski y B. Berger-Bachi. 1999. The essential *Staphylococcus aureus* gene *femB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycina interpeptide formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9351-6.
- civ Strandén, A.M., K. Ehlert, H. Labischinski y B. Berger-Bachi. 1997. Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179:9-16.

- 
- cv Gustafson, J., A.Strassle, H. Hachler, F.H. Kayser y B. Berger-Bachi. 1994. The femC locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon. J. Bacteriol. 176:1460-7.
- cvii Stranden, A.M., M Ross y B. Berger-Bachi. 1996. Glutamine synthetase and heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microb. Drug Resist. 2:201-7.
- cvii Jolly,L., S.Wu, J.van Heijenoort, H. De Lencastre, D. Mengin-Lecreux y A. Tomasz. 1997. The femR315 gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which result in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. J. Bacteriol. 179:5321-5.
- cviii Ornela-Soares, A., H. de Lencastre, B.L. de Jorge y A. Tomasz. 1994. Reduced methicillin resistance in a new *Staphylococcus aureus* transposon mutant that incorporates muramyl dipeptides into the cell wall peptidoglycan. J. Biol. Chem. 269:27246-50.
- cix Piriz Duran, S., F.H. Kayser y B. Berger-Bachi. 1996. Impact of sar and agr on methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 141:255-60
- cx NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically Approved Standard M7-A4. National Committee for Laboratory Standards
- cxii NCCLS. 2003. Performance standards for disc antimicrobial susceptibility tests Approved Standard M2-A6. National Committee for Laboratory Standards.
- cxii Kluytmans, J., A. Van Griethuysen, P. Willemse y P. Van Keulen. 2002. Performance of CHROMagar Selective Medium and Oxacillin Resistance Screening Agar Base for Identifying *Staphylococcus aureus* and Detecting Methicillin. J. Clin. Microbiol. 40:2480-2.
- cxiii Murakami, K., W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka y S. Watanabe. 1991. Identification of methicillin-resistant strain of staphylococci by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29:2240-4.
- cxiv Kreiswirth, B,m J. Kornblum, R.D. Arbeit, W. Eisner, J.N. Maslow, A. McGeer, D.E. Low, y R.P Novick. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science. 259:227-230.
- cxv L' Heriteau, F., J.C. Lucet, A. Scanvic y E. Bouvet. 1999. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and familial transmission. Jama. 282:1038-9.
- cxvi van Leeuwen, N. 2002. Binary typing of *Staphylococcus aureus*. Erasmus university, Rotterdam
- cxvii Enright, M.C., D.A. Robinson, G. Randle, E.J. Feil, H. Grundmann y B.G. Spratt. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:7687-92.

- 
- <sup>cxviii</sup> Parker, M. 1983. The significance of phage-typing in *Staphylococcus aureus*. Academic Press, London
- <sup>cxix</sup> Parker, M. 1972. Phage-typing of *Staphylococcus aureus*, vol. 7B. Academic Press, London.
- <sup>cxx</sup> Aucken, H.M. y K. Westwell. 2002. Reaction difference rule for phage typing of *Staphylococcus aureus* at 100 times the routine test dilution. *J. Clin. Microbiol.* 40:292-3.
- <sup>cxxi</sup> Marples, R.R. y V.T. Rosdahl. 1997. International quality control of phage typing of *Staphylococcus aureus*. International Union of Microbial Societies Subcommittee. *J. Med. Microbiol.* 46:511-6.
- <sup>cxixii</sup> Selander, R.K., D.A. Caugant, H. Ochman, J.M. Musser, M.N. Gilmour y T.S. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:873-84.
- <sup>cxixiii</sup> Seki, K., J. Sakurada, M. Murai, A. Usui, H.K. seong, H. Jitsukawa y S. Masuda. 1995. Auxiliary method for clonal identification of *Staphylococcus aureus* by protein band pattern of released proteins on SDS-polyacrylamida gel. *Microbiol. Immunol.* 39:615-7.
- <sup>cxixiv</sup> Tenover, F.C., R. Arbeit, G. Archer, J. Biddle, S. Byrne, R. Goering, G. Hancock, G.A. Hebert, B. Hill, R. Hollins y et al. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 32:407-15.
- <sup>cxixv</sup> van Belkum, A. 2000. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain: state of affairs and tomorrow's possibilities. *Microb. Drug Resist.* 6:173-88.
- <sup>cxixvi</sup> Frenay, H.M., A.E. Bunschoten, L.M. Schouls, W.J. van Leeuwen, C.M. Vandenbroucke-Grauls, J. Verhoef y F.R. Moii. 1996. Molecular Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:60-4.
- <sup>cxixvii</sup> Hoefnagels-Schuermans, A., W.E. Peetermans, M.J. Struelens, S. Van Lierde y J. Van Eldere. 1997. Clonal analysis and identification of epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 35:2514-20
- <sup>cxixviii</sup> Goh, S.H., S.K. Byrne, J.L. Zhang y A.W. Chow. 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 30:1642-5
- <sup>cxixix</sup> van Belkum, A., N. Riewerts Ericksen, M. Sijmons, W. van Leeuwen, M. VandenBergh, J. Kluytmans, F. Espersen y H. Verbrugh. 1996. Are variable repeats in the spa gene suitable targets for epidemiological studies of methicillin-resistant of *Staphylococcus aureus* strain? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:768-70.
- <sup>cxixxx</sup> Del Vecchio, V.G., J.M. Petroziello, M.J. Gress, F.K. McCleskey, G.P. Melcher, H.K. Crouch y J.R. Lupski. 1995. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:2141-4.

- 
- cxxx i Olmos, A., J.J. Camarena, J.M. Nogueira, J.C. Navarro, J. Risen y R. Sanchez. 1998. Application of an optimized and highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infection. *J. Clin. Microbiol.* 36:1128-34.
- cxxx ii Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic. Acids Res.* 23:4407-14.
- cxxx iii van Leeuwen, W., C. Libregts, M. Schalk, J. Veuskens, H. Verbrugh y A. Van Belkum. 2001. Binary typing of *Staphylococcus aureus* strain through reversed hybridization using digoxigenin-universal linkage system-labeled bacterial genomic DNA. *J. Clin. Microbiol.* 39:328-31.
- cxxx iv van Belkum, A., W. van Leeuwen, R. Verkooyen, S.C. Sacilik, C. Cokmus y H. Verbrugh. 1997. Dissemination of a single clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Turkish hospital. *J. Clin. Microbiol.* 35:978-81.
- cxxx v van Leeuwen, W., A. van Belkum, B. Kreiswirth y H. Verbrugh. 1998. Genetic diversification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a function of prolonged geographic dissemination and as measured by binary typing and other genotyping methods. *Res. Microbiol.* 149:497-507.
- cxxx vi Schwartz, D.C. y C.R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-size DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75.
- cxxx vii Maiden, M.C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman y B.G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:3140-5.
- cxxx viii van Belkum, A., W. van Leeuwen, M.E. Kaufmann, B. Cookson, F. Forey, J. Etienne, R. Goering, F. Tenover, C. Steward, F. O'Brien, W. Grubb, P. Tassios, N. Legakis, A. Morvan, N. El Solh, R. De Ryck, M. Struelens, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkila, M. Kooistra, A. Talens, W. Witte y H. Verbrugh. 1998. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of Sma I macrorestriction fragments: a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 36:1653-.
- cxxx ix Chambers, H. F. 1993. Detection of methicillin resistant staphylococci. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 7:425-433.
- cxl Unal, S., K. Wener, P. DeGirolami, F. Barsanti y G. Elioponlos. 1994. Comparison of tests for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a clinical microbiology laboratory. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:345-347.
- cxli York, M.K., L. Gibbs, F. Chehab y G.F. Brooks. 1996. Comparison of PCR detection *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 34:249-253.



- 
- cxlii Tanja M., Dickinson and Gordon L. Archer. 2000. Phenotypic expression of Oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: Roles of *mecA* transcriptional regulation and Resistant-subpopulation selection. *Antimicrob. Agent Chemoter.* Vol 44. 6:1616-1623.
- cxliii Smole Sandra, et al. 1998. Sensitivity and Specificity of an Improved Rapad Latex Agglutination Test for Identificatio of Methicillin – Sensitive and Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38:1109-1112.
- cxliv Louie. L. et al. 2000. Evaluation of Three Rapid Methods for Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38:2170-2173.
- cxlv Petinaki, E., Arbaniti, G., Dimitracopoulos, G., Espiliopoulou. 2001. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of Methicillin-resistant staphylococci by combined Polymerase Chain Reaction. *J. Antimicrob. Chemother.* Vol. 47,297 - 304
- cxlvi Duarte C., Alexander Thomasz, de Lencastre H. 2002. Secrets of Success of a human pathogen: Molecular evolution of pandemic clones of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet.* Vol. 2 180-189.
- cxlvii Katayama, Y., Ito, T., and Hiramatsu, K. 2001. Genetic Organization of Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431 – Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA* – Carrying Low-level Methicillin – Resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob.agents Chemother.* Vol 45.7;1955-1963.
- cxlviii Embder, M., McCallum, N., Adhikari, r. and Berger-Bächi. B. 2004. Fitness Cost of SCC*mec* and Methicillin Resistance Levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol 48. 6 : 2295- 2297.
- cxlix Noriko Kondo, Kyoko Kuwahara-Arai, Hiroko Kuroda-Murakami, Eiko Tateda-Suzuki, and Keiichi Hiramatsu. 2001. Eagle-Type Methicillin Resistance: New Phenotype of High Methicillin Resistance under *mec* Regulator Gene Control. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 45.3:815-824.
- cl Shore Anna, Rossney, S. et al. 2005. Seven Novel Variants of the Staphylococcal chromosomal cassette *mec* in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Ireland. *Antimicrob. Agents of Chemoter.* 49.5: 2070-2083
- cli Gregory P. Lewis, R., et al. 1997. Studies of the Repressor (*blaI*) of B-lactamasa synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 24:1025-1037.
- clii Ito, T., Xiao Xue Ma, et al. 2004. Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Driven by a Novel Cassette Recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48.7: 2637-2651
- cliii Panlilio, A., et al. 1992. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in U. S. Hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* Vol. 13:582-586
- cliv Mackay, A. D. et. al. 1993. Coagulase Negative Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Lancet* 342:492.

---

<sup>clv</sup> Vandenesch, F. et al. 1993. Coagulase-Negative *Staphylococcus aureus*. Lancet 342:994-995

<sup>clvi</sup> Vandenesch, F. et al. 1994. Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi* subspecies from human patients. J. Clin. Microbiol. 32:388-392

<sup>clvii</sup> Matthew a. Wicler, et al. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol 25 N° 1. 46.