

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CLONES DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA EN AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE PACIENTES
PEDIÁTRICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SANTANDER**

MAYRA ALEJANDRA MACHUCA PÉREZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2012**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CLONES DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA EN AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE PACIENTES
PEDIÁTRICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SANTANDER**

MAYRA ALEJANDRA MACHUCA PÉREZ

Trabajo de grado presentado para optar al título de
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Dirigido por:

CLARA ISABEL GONZALEZ RUGELES, M.Sc. Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2012

DEDICATORIA

Dedico este logro a mis padres por su apoyo incondicional, por su amor que día a día me alentó a seguir adelante, sus enseñanzas y la guía que me han dado en las decisiones que he tomado en mi vida.

A mi hermanita, mi mejor amiga por siempre estar conmigo.

Y a toda mi familia, por el cariño que siempre me han dado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios a quien le debo la vida y lo que soy.

A la Doctora Clara Isabel, a quien agradezco el haberme permitido hacer parte de su Grupo, quien me ha motivado a amar cada día más la investigación. Por su paciencia y dedicación, que han hecho de mi una mejor persona.

Al Doctor Luis Miguel Sosa mis agradecimientos por todo su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis compañeritos del Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular – GIEM por siempre apoyarme durante todos estos años y convertirse en mis amigos.

A Linda, Vivi, JuanGui y Lauro, mis compañeros de maestría, por su amistad incondicional y el aprendizaje que sin ustedes no habría sido igual.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.1 GENERALIDADES	16
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	17
1.3 FISIOPATOGENIA	18
1.3.1 Componentes de la pared bacteriana	18
1.3.1.1 Peptidoglicano	19
1.3.1.2 Ácidos teicóicos	20
1.3.1.3 Cápsula	20
1.3.1.4 Proteínas de superficie	22
1.3.2 Factores de virulencia	22
1.3.2.1 Enzimas	23
1.3.2.2 Toxinas	24
1.3.3 Cuadros clínicos	27
1.3.3.1 Infecciones de piel y tejidos blandos	27
1.3.3.2 Infecciones músculo-esqueléticas	28
1.3.3.3 Infecciones de vías respiratorias	29
1.3.3.4 Bacteriemia y endocarditis bacteriana	29
1.3.3.5 Cuadros producidos por toxinas estafilocócicas	30
2. GENÉTICA DE <i>S. aureus</i>	31
2.1 PLASMIDOS	32
2.2 BACTERIÓFAGOS	32
2.3 ISLAS GENÓMICAS Y DE PATOGENICIDAD	32
2.4 OTROS ELEMENTOS TRANSPONIBLES	33

3. RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS EN <i>S. aureus</i>	35
3.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	35
3.1.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular	36
3.1.2 Inhibición de la síntesis proteica	36
3.1.3 Bloqueo de la síntesis de ácidos nucleicos	36
3.2 HISTORIA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN <i>S. aureus</i>	37
3.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	38
3.3.1 Resistencia a betalactámicos	39
3.3.2 Resistencia a vancomicina	41
3.3.3 Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas	43
3.3.4 Resistencia a quinolonas	44
3.4 RESISTENCIA A METICILINA	44
3.4.1 Gen <i>mecA</i> y <i>SCCmec</i>	45
4. SARM	52
4.1 EPIDEMIOLOGÍA DE SARM	52
4.2 CLONES EPIDÉMICOS Y EVOLUCIÓN	55
4.3 SARM-CO Y SARM-H	59
4.4 INFECCIONES NOSOCOMIALES CAUSADAS POR SARM-CO	61
5. TIPIFICACIÓN DE SARM	63
5.1 FUNDAMENTO Y APLICACIONES	63
5.2 TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN	63
5.2.1 PFGE	64
5.2.2 Tipificación del gen <i>spa</i>	64
5.2.3 MLST	65
6. OBJETIVOS	66
6.1 OBJETIVO GENERAL	66
6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	66

7. MATERIALES Y MÉTODOS	67
7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	67
7.2 IDENTIFICACIÓN DE SARM	67
7.3 EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO	67
7.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE SARM	68
7.5 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS DE SARM	69
7.5.1 MLST	69
7.5.2 Tipificación de SCCMEC	72
7.5.3 Tipificación del Gen SPA	72
8. RESULTADOS	74
8.1 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MLST	74
8.2 TIPIFICACIÓN DE SCCMEC	75
8.2.1 Asociación entre STs y el tipo de SCCmec	77
8.3 TIPIFICACIÓN DEL GEN SPA	78
8.3.1 Asociación entre ST y tipo de spa	78
8.4 CLONES DE SARM Y LAS INFECCIONES EN EL SERVICIO DE INFECTOPEDIATRÍA DEL HUS	79
9. DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES	89
RECOMENDACIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	91

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología de <i>S. aureus</i> .	16
Figura 2. Componentes de la pared de <i>S. aureus</i> .	19
Figura 3. Estructura del peptidoglicano, ácido teicoico y lipoteicoico	21
Figura 4. Estructura de los elementos genéticos móviles encontrados en el genoma de la cepa USA300 (FR3757).	34
Figura 5. Sitios de acción de los antibióticos.	35
Figura 6. Evolución de la resistencia antimicrobiana en <i>S. aureus</i> .	40
Figura 7. Estructura química del ácido 6-aminopenicilínico y la meticilina	45
Figura 8. Inducción de la síntesis de PBP2-a en presencia de meticilina.	46
Figura 9. Comparación de los tipos de SCCmec encontrados en <i>S. aureus</i> .	50
Figura 10. Porcentaje de aislamientos de SARM en estudios realizados en países de América Latina.	54
Figura 11. Distribución y diseminación de los clones de SARM en países de América Latina y el Caribe.	58
Figura 12. Distribución de los STs detectados.	76
Figura 13. Relación entre los clones de SARM y el origen de infección	80

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Infecciones causadas por <i>S. aureus</i>	28
Tabla 2. Tipos de SCCmec identificados en <i>S. aureus</i>	48
Tabla 3. Clasificación del origen de las infecciones por SARM	62
Tabla 4. Secuencia de iniciadores que amplifican los genes nuc y meca	69
Tabla 5. Iniciadores para la amplificación de los fragmentos génicos en la MLST.	70
Tabla 6. Perfil alélico de las cepas de SARM	74
Tabla 7. Tipos de SCCmec identificados entre los aislamientos de SARM	75
Tabla 8. Distribución de los tipos de SCCmec entre los STs identificados	77
Tabla 9. Tipos de spa identificados en los aislamientos de SARM	78
Tabla 10. Distribución de los tipos de spa entre los STs identificados	79
Tabla 11. Relación entre los clones de SARM y el origen de infección	80
Tabla 12. Infecciones causadas por clones de SARM	81

RESUMEN

Título: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CLONES DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA EN AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SANTANDER*

Autor: MAYRA ALEJANDRA MACHUCA PÉREZ**

Palabras claves: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, MLST, gen spa, SCCmec.

Descripción

La tipificación molecular de cepas bacterianas es una parte importante de la vigilancia epidemiológica y el control de las infecciones hospitalarias y adquiridas en comunidad. Para el caso de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), existen múltiples métodos de tipificación molecular, con metodologías que van desde aquellas, basadas en técnicas de bandeo hasta las de comparación de secuencia, de esta forma se ha podido demostrar su alta variabilidad genética.

Estas metodologías han sido utilizadas en estudios epidemiológicos con el fin de entender el comportamiento de las infecciones por SARM y establecer medidas de control de la infección y diseminación. Por lo anterior, en este trabajo se seleccionaron tres técnicas de tipificación molecular: la MLST, la tipificación del gen spa y SCCmec como herramientas para la identificación de clones de SARM aisladas en pacientes pediátricos del Hospital Universitario de Santander.

Entre los aislados se identificaron 8STs diferentes, ST8 fue el más frecuente (34/53) seguido por ST5 (9/53). Los aislamientos fueron distribuidos en un grupo con ST8 como genotipo fundador, ST254, ST552 y ST931 y 4 “singletons”. La identificación de diferentes STs entre los aislamientos refleja la alta variabilidad genética que presenta *S. aureus*.

La caracterización molecular de los aislamientos de SARM permitió la detección de un clon predominante el ST8-MRSA-IV relacionado genéticamente con el clon USA-300 y en menor proporción los clones: ST5-MRSA-IV y ST5-MRSA-I (clon Pediátrico y Cordobés/Chileno respectivamente), así como clones menores entre la población de SARM estudiada. La identificación de los clones de SARM realizada en este estudio constituye el primer paso para la comprensión de la epidemiología molecular de las infecciones de SARM en nuestra región.

* Proyecto de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Departamento de Ciencias Básicas. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Ph.D. Clara Isabel Gonzalez Rugeles

ABSTRAC

Title: MOLECULAR IDENTIFICATION OF METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* CLONES ISOLATES FROM PEDIATRIC PATIENTS AT THE HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SANTANDER*

Author: MAYRA ALEJANDRA PEREZ MACHUCA**

Keywords: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MLST, spa gene, SCCmec.

Description

Molecular typing of bacterial strains is an important part of epidemiological surveillance and control of hospital and community-acquired infections. Currently, several molecular methods have been describe to characterized methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates with methods ranging from banding techniques to the sequence comparison, and it has been demonstrated the high genetic variability between MRSA strains worldwide.

The molecular typing has been used in epidemiological studies to understand the behavior of MRSA infections and to propos control measures that prevent the MRSA spread. Therefore, in this work we selected three molecular typing techniques: the MLST, spa and SCCmec typing as a tool for identifying MRSA clones isolated in pediatric patients at the Hospital Universitario de Santander.

Among isolates were identified 8STs. ST8 was the most common (34/53) followed by ST5 (9/53). The isolates were distributed in a group with ST8 as genotype founder, ST254, ST552 and ST931 and 4 "singletons". The identification of different STs among isolates reflects the high genetic variability that presents *S. aureus*.

Molecular characterization of MRSA isolation allowed the detection of a predominant clone, ST8-MRSA-IV genetically related to the USA-300 clone, the clones: ST5-MRSA-IV and ST5-MRSA-I (Pediatric clone and Cordovan / Chilean respectively) and minor clones of MRSA in the population studied. Identification of clones of MRSA in this study is the first step to understanding the molecular epidemiology of MRSA infections in our region.

* Work degree

** Health Faculty, Basic Science Department. Master in Basic Biomedical Sciences. Director: Ph.D. Clara Isabel Gonzalez Rugeles

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva que afecta humanos y otros mamíferos. Su importancia clínica radica en su amplia diseminación a nivel mundial causando infecciones hospitalarias y adquiridas en comunidad. Desde su descubrimiento en 1880 se ha observado que las infecciones debidas a *S. aureus* presentan un amplio espectro clínico, que incluye infecciones de piel, síndrome de choque tóxico, endocarditis, osteomielitis e infecciones de heridas quirúrgicas.

Antes de la introducción de la penicilina como tratamiento antimicrobiano, la mortalidad debida a la infección con *S. aureus* se estimaba en 80%, representando un problema de salud pública. En 1942 la penicilina empezó a utilizarse a nivel mundial en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* y sólo dos años después de su implementación, se aisló la primera cepa hospitalaria resistente y posteriormente se detectaron también cepas resistentes a nivel comunitario. Ya en 1960 los aislamientos de *S. aureus* resistentes a penicilina alcanzaban el 80%. En 1961, dos años después de la introducción de la meticilina, las cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina también desarrollaron resistencia a este otro fármaco por la adquisición del gen *mecA* y se denominaron SARM (*S. aureus* Resistente a Meticilina).

El gen *mecA* codifica para una proteína de unión a penicilina, PBP2-a (Penicillin-binding Protein-2a), que presenta baja afinidad por la meticilina, inhibiendo por lo tanto su efecto en el proceso de división celular. El gen *mecA* es transportado por la isla de patogenicidad SCCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) que adicionalmente porta otros genes de resistencia a antibióticos.

SARM es reconocido como el patógeno nosocomial más frecuentemente aislado; aunque durante muchos años estuvo restringido a hospitales (SARM origen hospitalario; SARM-H), la emergencia de cepas de origen comunitario (SARM-CO)

ha renovado la atención hacia él. SARM-H y SARM-CO presentan características moleculares diferentes, que incluyen variaciones en los perfiles de susceptibilidad a antibióticos y factores de virulencia.

Los análisis comparativos entre los primeros y últimos aislados de SARM hasta el momento han postulado dos hipótesis para sustentar el origen de estas cepas. La primera sugiere que los SARM descienden de un mismo ancestro común que adquiere una sola vez el SCCmec. Sin embargo, la segunda hipótesis, que se encuentra sustentada en los análisis de tipificación molecular que identifican diferentes SCCmec en un linaje particular, sugiere que los SARM adquieren varias veces diferentes tipos de SCCmec hasta que logran estabilidad biológica.

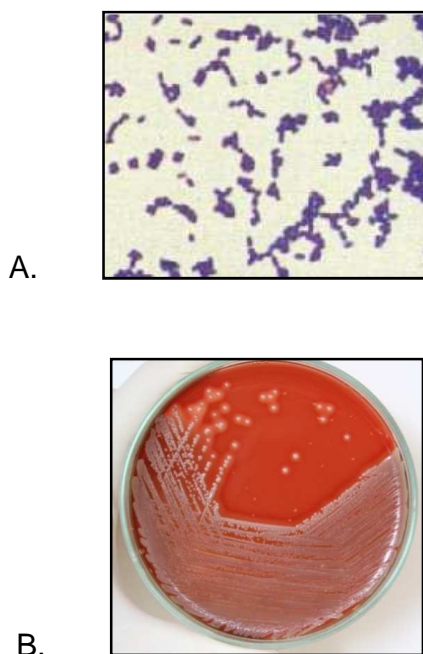
Debido al incremento en la frecuencia del SARM como agente causal de infecciones nosocomiales y adquiridas en comunidad se hace necesaria la caracterización molecular de este tipo de aislamientos, así como la búsqueda e identificación de clones epidémicos que se diseminan entre hospitales y comunidad. Esta información permitirá tener una comprensión epidemiológica de las infecciones por este microorganismo e implementar medidas apropiadas para el control de infecciones por SARM, evitando su diseminación y generación de brotes. Por lo tanto se propone investigar ¿Cuáles son los complejos clonales de SARM obtenidos de pacientes pediátricos del Hospital Universitario de Santander?

1. *Staphylococcus aureus*

1.1 GENERALIDADES

S. aureus es un coco Gram positivo que pertenece al género *Staphylococcus* de la familia *Microcococaceae*. Los estafilococos son cocos pequeños que miden de 0.5 hasta 1 μm , inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, no forman esporas y crecen en agrupaciones que semejan racimos de uvas (Figura 1A). Los estafilococos crecen fácilmente sobre la mayoría de medios de cultivo bacteriológicos en condiciones aerobias y microaerofilicas y con mayor rapidez a 37°C. En medio sólido forman colonias redondas, lisas, prominentes y brillantes (Brooks, et al. 2010).

Figura 1. Morfología de *S. aureus*.



(A) Tinción de Gram de un cultivo de *S. aureus* (B) Crecimiento en placa de agar sangre de colonias doradas de *S. aureus*.

Existen 35 especies en el género *Staphylococcus* y 17 subespecies. Las especies que se asocian con más frecuencia a las enfermedades en humanos son *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* y *S. warneri*.

S. aureus es la especie más virulenta y patógena para el hombre, pero también se encuentra colonizando piel y mucosas en individuos sanos. Las colonias de *S. aureus* poseen un característico color dorado (Figura 1B) debido a la producción de carotenoides durante el crecimiento, sin embargo hay cepas no pigmentadas que poseen colonias de color grisáceo. *S. aureus* es catalasa, coagulasa y DNasa positiva, resiste altas concentraciones de NaCl, motivo por el cual crece fácilmente en medio manitol salado (5% de NaCl), fermentando adicionalmente el manitol como fuente principal de carbono. Estas características microbiológicas lo diferencian de las demás especies del género *Staphylococcus* (Bannerman 2003).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

S. aureus es un patógeno que afecta humanos y mamíferos (Lowy 1998). Su importancia clínica radica en su amplia diseminación a nivel mundial causando infecciones hospitalarias y adquiridas en comunidad (Fridkin, et al. 2005). Según estimaciones recientes más de 400.000 hospitalizaciones por infecciones con *S. aureus* ocurren por año en Estados Unidos (Nubel, et al. 2008), de las cuales 19.000 son mortales (Boucher and Corey 2008). En Latinoamérica, países como Brasil reportan que *S. aureus* es el agente responsable del 19% de las infecciones nosocomiales, de los cuales entre el 50 y 60% son *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) (Casellas 2006), Argentina ha reportado prevalencias de SARM que superan el 50% en algunos hospitales (Sola, et al. 2007). En Colombia, la prevalencia de SARM en hospitales es cercana al 52%, sin embargo, la prevalencia varía considerablemente de una localidad a otra (Jaramillo 1996; Pérez, et al. 2003).

En la década de los 90's *S. aureus* fue la causa más común de casos de infección en heridas quirúrgicas y neumonía y la segunda causa de bacteriemia en hospitales (Lowy 1998). Con el surgimiento de las cepas de SARM se renovó la atención en esta bacteria, no solo por la complejidad en el tratamiento de las infecciones, sino por la presentación de cuadros clínicos más severos y su rápida capacidad de diseminación a nivel hospitalario y en la comunidad. Esta rápida diseminación y el probable incremento de la patogenicidad sugieren la presencia de determinantes de virulencia diferentes a su contraparte sensible (Lowy 1998).

Además de la alta frecuencia de infección que tiene *S. aureus*, aproximadamente del 20 al 30% de la población global está colonizada de forma persistente por este microorganismo, constituyendo un grupo de individuos a riesgo de desarrollar infección (von Eiff, et al. 2001) (Kluytmans, et al. 1997) e infectar a otros individuos sanos. Igualmente del 60 al 100% de los individuos llegan a estar colonizados transitoriamente en algún periodo de sus vidas (Lamers, et al. 2011).

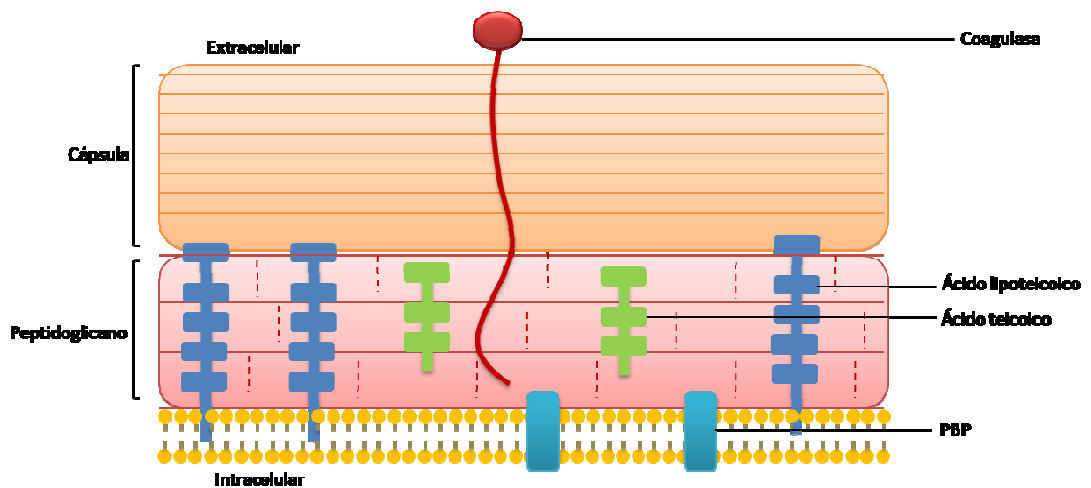
1.3 FISIOPATOGENIA

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

1.3.1 Componentes de la pared bacteriana

La pared de *S. aureus* está compuesta de polisacáridos, lípidos y proteínas transmembranales y algunas que atraviesan la pared y le confieren rigidez, estabilidad y especificidad antigénica (Figura 2).

Figura 2. Componentes de la pared de *S. aureus*.



1.3.1.1 Peptidoglicano

El peptidoglicano es el principal componente de la pared celular de *S. aureus*, representando el 50% de los constituyentes y confiriéndole la rigidez a la pared bacteriana. Está formado por una matriz de polisacárido compuesta por subunidades de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidas mediante enlaces β 1, 4. Adicionalmente las cadenas de peptidoglicano están entrelazadas mediante la unión de dos subunidades de ácido N-acetilmurámico que forman un puente intercatenario de cinco glicinas (pentaglicina) (Figura 3A).

El peptidoglicano tiene actividad endotóxica, estimula la producción en monocitos y macrófagos de citoquinas y quimioquinas ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 y IL-8). Adicionalmente activa el complemento y la agregación plaquetaria (Fournier and Philpott 2005).

1.3.1.2 Ácidos teicóicos

Son polisacáridos ácidos que contienen glicerolfosfato o residuos de fosfato de ribitol que están unidos al peptidoglicano por enlaces tipo éster de fosfato. Algunas de estas estructuras pueden estar asociadas con lípidos de la membrana celular y se denominan ácidos lipoteicóicos (Figura 3B y 3C). Tanto los ácidos teicóicos como los lipoteicóicos se encuentran altamente cargados confiriéndole una carga negativa neta a la superficie celular y algunas veces se asocian con proteínas para formar complejos.

Estas moléculas participan en varios procesos biológicos como el balance de cationes en la superficie celular, la división celular y regulación de la autólisis del peptidoglicano y adherencia a mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina (Ruhland and Fiedler 1990). Aunque no son muy inflamatorias, estas moléculas podrían contribuir a la sepsis, estimular en monocitos y macrófagos la producción de citoquinas y quimioquinas e inducir la síntesis de anticuerpos específicos (Fournier and Philpott 2005).

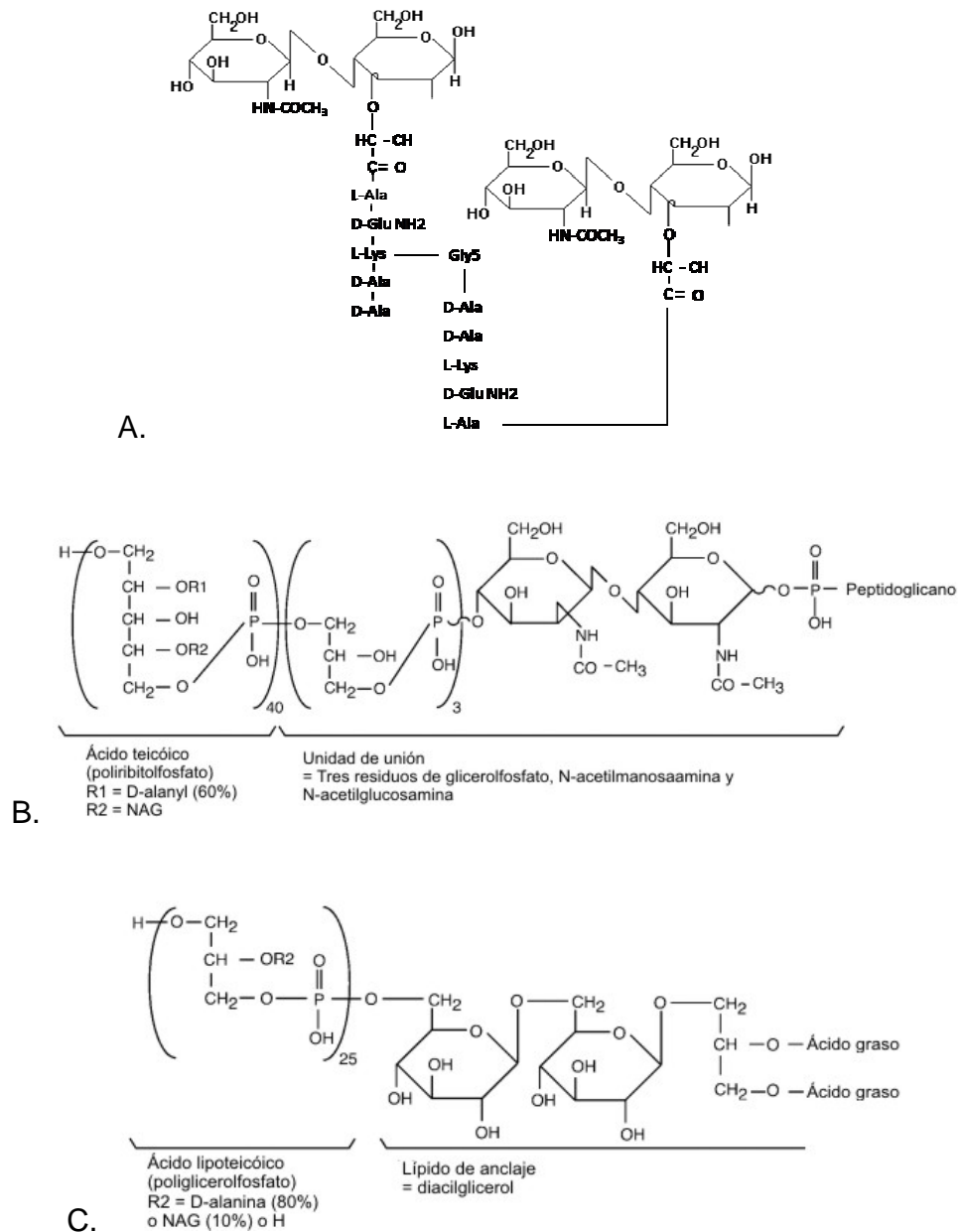
1.3.1.3 Cápsula

La cápsula o glicocalix está constituida por exopolisacáridos secretados en la superficie bacteriana y se extiende alrededor de la célula. Se han descrito 11 serotipos capsulares, entre los cuales los serotipo 5 y 8 son los más frecuentemente asociados a infecciones en humanos (Hochkeppel, et al. 1987).

Este polisacárido capsular incrementa la virulencia de *S. aureus* ya que le confiere resistencia a la fagocitosis por el enmascaramiento de opsoninas como moléculas del complemento (fragmento C3b) y anticuerpos específicos contra constituyentes de la pared celular que se depositan debajo de la cápsula. La cápsula impide la interacción de C3b ó los anticuerpos depositados y su respectivo receptor en las

células fagocíticas. Sin embargo, en presencia de anticuerpos específicos para la cápsula la fagocitosis es exitosa (O'Riordan and Lee 2004).

Figura 3. Estructura del peptidoglicano, ácido teicoico y lipoteicoico



(A) Estructura del peptidoglicano, (B) Ácido teicoico y (C) Ácido lipoteicoico.

1.3.1.4 Proteínas de superficie

Diferentes proteínas pueden estar ancladas en la pared bacteriana muchas de las cuales comparten características estructurales y funcionales. Muchas de estas proteínas facilitan la adhesión de *S. aureus* a diversos tejidos. *S. aureus* expresa un grupo de **adhesinas** denominadas “*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*” (MSCRAMMs) donde se incluyen la proteína de unión a la fibronectina (Hynes 1992), la proteína de unión al fibrinógeno (Boden and Flock 1994; Cheung, et al. 1995), adhesinas de unión a la elastina (Park, et al. 1996), al colágeno (Patti, et al. 1992) y una adhesina de amplia especificidad que facilita la unión a diversas proteínas del hospedero como la sialoproteína I, colágeno, fibronectina, fibrinógeno, vitronectina y sialo- proteína ósea (McGavin, et al. 1993).

Otras proteínas de superficie son la coagulasa o factor de agregación (Clumping factor) el cual facilita la agregación bacteriana mediante la unión al fibrinógeno y la proteína A que tiene la habilidad de unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas inhibiendo la opsonización y fagocitosis.

1.3.2 Factores de virulencia

S. aureus como microorganismo patógeno para el hombre produce una gran variedad de cuadros clínicos que pueden ser consecuencia de la presencia de factores de virulencia propios. La mayoría de los casos de enfermedades severas suelen ser explicados por causas multifactoriales y la acción de diferentes factores de virulencia, sin embargo en las patologías causadas por toxinas como el síndrome del choque tóxico la patogénesis es atribuida a un determinante de virulencia específico.

1.3.2.1 Enzimas

S. aureus produce una gran variedad de enzimas que actúan cerca del foco de infección destruyendo el tejido y facilitando la diseminación de la infección al tejido adyacente (Bannerman 2003).

- **Catalasa:** esta enzima degrada el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno protegiendo al microorganismo durante la eliminación en el fagolisosoma.
- **Coagulasa:** puede encontrarse asociada a la pared bacteriana o de forma secretada. Estimula la coagulación convirtiendo el fibrinógeno en fibrina, favorece la sepsis y la formación de abscesos.
- **Hialuronidasa:** facilita la diseminación de los microorganismos por la matriz extracelular ya que destruye el ácido hialurónico, un polisacárido que proporciona sostén a células y tejidos.
- **Penicilinasa:** β -lactamasa que hidroliza el anillo β -lactámico de las penicilinas inactivando la función del antibiótico.
- **Nucleasas:** hidrolizan el ADN y ARN de células eucariotas contribuyendo a las lesiones tisulares.
- **Otras enzimas:** las cepas de *S. aureus* adicionalmente producen otras enzimas como lipasas, fosfolipasas o estererasas que metabolizan lípidos, proteasas y estafilocinasas que destruyen los coágulos de fibrina facilitando la diseminación.

1.3.2.2 Toxinas

Algunas cepas de *S. aureus* pueden producir proteínas extracelulares que poseen diversas propiedades biológicas y ejercen su acción en zonas distantes de la infección. Estas toxinas se agrupan dependiendo del mecanismo de acción en toxinas pirogénicas o superantígenos, toxinas exfoliativas, leucocidinas (citólíticas) y otras toxinas (Rogolsky 1979). Los genes codificantes para estas proteínas o toxinas pueden encontrarse integrados en el cromosoma bacteriano, en ADN plasmídico ó movilizados por secuencias de inserción (IS) y transposones (Malachowa and DeLeo 2010).

- ***Hemolisinas***

Son toxinas que afectan la permeabilidad de la membrana plasmática de diferentes tipos de células, generando en la mayoría de los casos lisis celular. Inicialmente estas toxinas fueron llamadas hemolisinas debido a su capacidad de lisar eritrocitos. Además de su capacidad hemolítica estas toxinas tienen actividad citolítica contra leucocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos.

Las hemolisinas fueron diferenciadas según la capacidad de lisar eritrocitos de diferentes especies de mamíferos y actualmente se distinguen 4 tipos de hemolisinas la alfa, beta, delta y gamma.

La toxina alfa es producida por la mayoría de los aislamientos de *S. aureus* y participa en la generación del daño en los tejidos luego del establecimiento de la infección. Tiene acción hemolítica contra eritrocitos de conejo y es citolítica para una gran variedad de tipos celulares, en modelos animales se ha demostrado su capacidad dermonecrótica y neurotóxica (Khaziev and Mikhailova 2007).

La toxina beta o esfingomielinasa C presenta actividad citotóxica en la mayoría de células eucariotas produciendo hidrólisis de fosfolípidos de membrana como la esfingomielinina, afecta eritrocitos, leucocitos y macrófagos. Es hemolítica frente a la mayoría de eritrocitos ovinos y bovinos.

La toxina delta tiene una amplia actividad citolítica capaz de lisar protoplastos bacterianos, algunas organelas como lisosomas, mitocondrias y varios tipos de eritrocitos. Por su parte el espectro hemolítico frente a eritrocitos sensibles de la toxina gamma es diferente a las otras toxinas. La toxina gamma lisa eritrocitos humanos, de conejo, cabra, perro y aves, así como leucocitos y linfoblastos humanos.

- ***Leucocidina de Panton Valentine***

La leucocidina de Panton Valentine (PVL) es una toxina formadora de poro constituida por dos subunidades protéicas no asociadas, denominadas F y S (Kaneko and Kamio 2004; Prevost, et al. 1995). Estas subunidades son sintetizadas y secretadas independientemente y al asociarse, inducen lisis de células del sistema inmune como polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, induciendo la formación de poros que dañan la célula y alteran la permeabilidad de la membrana(Prevost, et al. 1995).

- ***Toxinas exfoliativas***

Las toxinas exfoliativas ó epidermiolíticas destruyen los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis sin producir citolisis ni inflamación, por lo tanto no se observa infiltrado celular ni bacterias en el sitio afectado. *S. aureus* produce tres tipos de toxina exfoliativa la ETA, ETB y ETD, estas dos toxinas pueden producir el síndrome de piel escaldada (Rogolsky 1979; Yamaguchi, et al. 2002). ETA se caracteriza por ser termoestable y estar codificada en el ADN cromosómico,

mientras que ETB es termolábil y de codificación plasmídica (Malachowa and DeLeo 2010; Yamaguchi, et al. 2001; Yamaguchi, et al. 2002).

- ***Toxinas pirogénicas superantígenos (PTSAgs)***

Esta familia incluye la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST1) y las enterotoxinas estafilocócicas. Estas toxinas actúan como superantígenos, los cuales a diferencia de los antígenos convencionales, se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II de las células presentadoras de antígeno en un sitio diferente a la unión antigénica y al mismo tiempo se unen a la cadena β del receptor de linfocito T (TCR) induciendo la proliferación policlonal de linfocitos T y la liberación de citoquinas (Fournier and Philpott 2005; Rogolsky 1979).

En el caso de TSST1 la actividad proinflamatoria está involucrada en el síndrome de choque tóxico y dermatitis atópica, induciendo la proliferación de células T y la liberación por linfocitos T y macrófagos de citoquinas proinflamatorias particularmente de TNF- α , un precursor esencial en el choque letal. TSST1 genera extravasación de las células endoteliales y en altas concentraciones tiene un efecto citotóxico.

Hasta el momento se han descrito 18 serotipos de enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, U) responsables de intoxicación alimentaria. Estas enterotoxinas son pequeños péptidos que presentan alta homología en su secuencia de aminoácidos, son termoestables y resistentes a la lisis por enzimas digestivas y al ácido estomacal. Algunas de ellas producen emesis y cuadros digestivos severos.

1.3.3 Cuadros clínicos

Las infecciones por *S. aureus* se producen al ocurrir lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la invasión del microorganismo desde la piel hasta los tejidos profundos y órganos principales. *S. aureus* es un patógeno piógeno que forma abscesos en los focos de infección local o diseminada (metástasis), desencadenando una reacción inflamatoria caracterizada por una respuesta de polimorfonucleares (PMN) y posterior infiltración de macrófagos y fibroblastos que delimitan la infección, con lo cual las infecciones por este microorganismo suelen ser supurativas. En los focos iniciales o primarios en piel y tejido celular subcutáneo la infección puede no ser controlada por la respuesta inmune del hospedero y progresar a infecciones diseminadas y severas como bacteremia y cuadros metastásicos (Brooks, et al. 2010).

1.3.3.1 Infecciones de piel y tejidos blandos

S. aureus es el agente causal de múltiples infecciones cutáneas caracterizadas por la formación de vesículas pustulosas que inician generalmente en los folículos pilosos y se extienden a tejidos adyacentes como la foliculitis y los forúnculos que pueden progresar a abscesos subcutáneos. Una infección más severa ocurre cuando más de un folículo se encuentra infectado llegando a afectar la capa más profunda del tejido celular subcutáneo, esta infección es conocida como ántrax. Otras infecciones de piel por *S. aureus* son impétigo, mastitis, hidrosadenitis supurativa, celulitis, fascitis y paroniquia (Tabla 1).

Tabla 1. Infecciones causadas por *S. aureus*

Infecciones de piel y tejidos blandos
Foliculitis, forunculosis, ántrax, celulitis, impétigo, mastitis, infección de heridas quirúrgicas, hidrosadenitis supurativa.
Infecciones músculo-esqueléticas
Artritis séptica, osteomielitis, piomiositis, absceso (del psoas).
Infección de vías respiratorias
Neumonía, émbolos pulmonares sépticos, empiema.
Bacteremia y sus complicaciones
Sepsis, síndrome del choque tóxico, focos metastásica, endocarditis infecciosa.
Endocarditis infecciosa
Infecciones en dispositivos (prótesis)
Enfermedades mediadas por toxinas
Síndrome del choque tóxico y dermatitis atópica, intoxicación alimentaria, síndrome exfoliativo estafilocócico.
Infecciones invasivas
Fascitis necrotizante, síndrome de waterhouse-fiderichsen, neumonía necrosante, purpura fulminante.

1.3.3.2 Infecciones músculo-esqueléticas

Las infecciones óseas en su mayoría son causadas por *S. aureus*, su diseminación y colonización puede darse vía hematológica o por contigüidad con un foco primario de infección. La presentación clínica más frecuente en niños es la osteomielitis hematológica en huesos largos y en adultos osteomielitis vertebral con afección del tejido esponjoso.

1.3.3.3 Infecciones de vías respiratorias

Las infecciones de vías respiratorias por *S. aureus* afectan frecuentemente a neonatos y lactantes con manifestaciones iniciales como disnea, fiebre e insuficiencia respiratoria; evolucionando a neumotórax y empiema. En adultos las infecciones pulmonares ocurren en personas intubadas (traqueotomía) o individuos reclusos en unidades de cuidados intensivos.

1.3.3.4 Bacteriemia y endocarditis bacteriana

A nivel mundial, *S. aureus* es la primera causa de bacteremia de origen nosocomial que puede complicarse a cuadros de mayor severidad como sepsis, endocarditis, vasculitis o metástasis a diferentes órganos. Las bacteremias de origen nosocomial se relacionan con el uso de prótesis, catéteres y otros procedimientos invasivos, mientras que en las bacteremias adquiridas en comunidad (individuos con ausencia de factores de riesgo) el foco de infección inicial suele ser extravascular, como infecciones primarias de piel que invaden tejido celular subcutáneo, neumonías o infecciones de vías respiratorias.

La frecuencia de endocarditis por *S. aureus* ha incrementado significativamente y en la actualidad constituye del 25 al 35% de los casos y como complicación de bacteremia del 5% al 21% (Chang, et al. 2003). Entre las complicaciones de endocarditis por *S. aureus* están la insuficiencia cardíaca por destrucción de las válvulas (mitral y aórtica), embolismos sépticos, abscesos hematógenos cerebrales, viscerales o miocárdicos y pericarditis purulenta.

1.3.3.5 Cuadros producidos por toxinas estafilocócicas

- ***Síndrome de piel escaldada***

Es una dermatitis exfoliativa ampollar que no afecta mucosas, se presenta con frecuencia en neonatos y niños.

- ***Síndrome de choque tóxico***

Es un cuadro grave debido a la producción de la toxina del choque tóxico – 1 (TSST-1, *Toxic Shock Syndrome Toxin - 1*). Inicialmente se describió en niños, sin embargo, posteriormente en mujeres jóvenes se relacionó con el uso de tampones en el periodo menstrual. El síndrome de choque tóxico inicia con síntomas inespecíficos similares a los del resfriado, hasta presentar signos de afección sistémica como vómito, diarrea, confusión, mialgias y dolor abdominal y en la etapa de convalecencia una o dos semanas después de la enfermedad se presenta descamación de la piel.

- ***Toxiinfección alimentaria o gastroenteritis tóxica estafilocócica***

Se debe a la ingestión de alimentos contaminados con toxinas y no por la presencia directa del microorganismo. Es un cuadro agudo generalmente afebril y autolimitado que cursa con vómito, dolor cólico y diarrea.

2. GENÉTICA DE *S. aureus*

El genoma de *S. aureus* está constituido por un cromosoma circular de aproximadamente 2800 Kb, contiene un 32% de G+C y el 83% es codificante, contiene un genoma central o “core” y un genoma accesorio. El genoma central contiene los genes vitales que codifican moléculas involucradas en metabolismo, síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y replicación. Cerca del 75% de las proteínas involucradas en los procesos de mantenimiento bacteriano comparten homología con el género *Bacillus sp.* El análisis de la subunidad 16S ribosomal revela una gran relación filogenética entre los dos géneros, con lo cual es probable que compartan un ancestro común del cual adquirieron más de la mitad del genoma (Baba, et al. 2002; Diep, et al. 2006). El genoma accesorio puede encontrarse integrado al cromosoma bacteriano o como material extracromosómico, éste representa un grupo de diversos genes que codifican proteínas requeridas para la adaptación de la bacteria a diferentes condiciones ambientales. Los genes accesorios son transportados en elementos genéticos móviles como plásmidos, bacteriófagos, secuencias de inserción y transposones (Figura 4), que poseen una concentración de G+C diferente a la del ADN cromosómico porque en la mayoría de los casos proviene de otras especies bacterianas (Hacker and Kaper 2000; Lindsay and Holden 2004).

La plasticidad del genoma de *S. aureus* le ha permitido obtener una gran cantidad de información genética. Existen tres mecanismos por los cuales una célula puede adquirir material genético: transformación, transducción y conjugación. En la transformación se da la adquisición de ADN presente en el medio de forma libre, en la transducción se transfiere el ADN de una célula a otra a través de una partícula viral y la conjugación involucra el contacto célula a célula y se da la transferencia de un plásmido conjugativo. Los tres mecanismos potencialmente llevan a cabo un cambio genético.

2.1 PLASMIDOS

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico que se replican de forma independiente del cromosoma bacteriano; contienen genes que codifican para la producción de toxinas, resistencia a antibióticos o metales pesados. Generalmente son adquiridos por transducción o conjugación.

2.2 BACTERIÓFAGOS

Los bacteriófagos pueden ser clasificados en tres grupos: líticos, temperados o crónicos, dependiendo del ciclo de vida en la célula bacteriana. Los fagos líticos lisan la célula completamente durante la liberación de la progenie viral, a diferencia de estos, los fagos crónicos liberan la progenie viral sin lisar la célula hospedera y los fagos temperados aunque tienen la capacidad de lisar la célula, generan una interacción a largo plazo con la célula hospedera y se integran al genoma bacteriano como un profago. Estos fagos transportan diferentes genes que codifican factores de virulencia como la Leucocidina de Panton Valentine (PVL, *Panton Valentine Leukocidin*), así como también conjuntos de genes organizados en islas de patogenicidad propias de *S. aureus*.

2.3 ISLAS GENÓMICAS Y DE PATOGENICIDAD

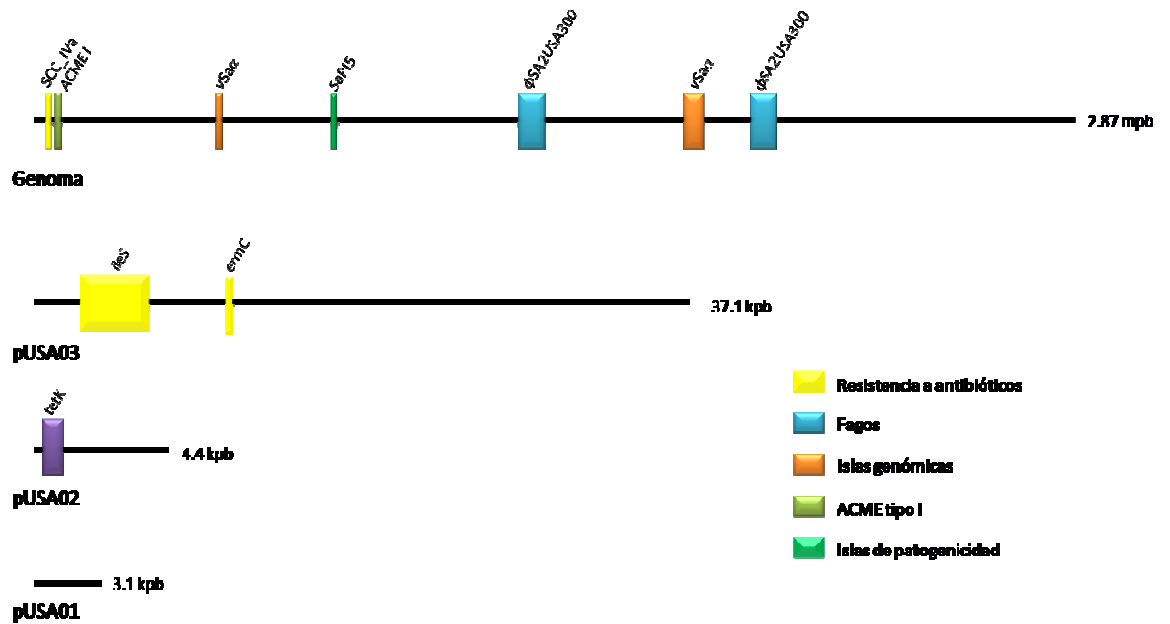
Existen tres familias de islas genómicas denominadas: vSA α , vSA β y vSA γ . Están compuestas por un fragmento de transposón y un sistema de restricción tipo I ubicados en los extremos, los dos fragmentos génicos se encargan de la estabilización de la isla genómica dentro del cromosoma bacteriano y flanquean el contenido genético de la isla factores de virulencia tipo enterotoxinas, leucotoxinas y proteasas. Las islas de patogenicidad son elementos genéticos móviles grandes de 14-17 Kb conformados por un grupo de genes denominados "core", altamente conservados, entre los cuales se incluyen dos marcos de lectura abiertos que

codifican para proteínas de regulación transcripcional y una región codificante para una integrasa, una helicasa y una terminasa. La mayoría de las islas de patogenicidad portan genes de enterotoxinas o TSST. Las islas de patogenicidad se integran al genoma de *S. aureus* en alguno de los seis sitios específicos en el cromosoma denominados *att_s*.

2.4 OTROS ELEMENTOS TRANSPONIBLES

Las secuencias de inserción y los transposones son elementos pequeños y altamente distribuidos en el genoma de *S. aureus*, pueden estar en una o en múltiples copias en el cromosoma u otro elemento móvil. Las secuencias de inserción pueden insertarse en varios loci causando cambios en la expresión de genes en el cromosoma bacteriano, ya sea por inactivación debido a la inserción directa en el marco de lectura o por un efecto polar sobre la transcripción de genes aledaños. Los transposones también pueden ser encontrados a lo largo del cromosoma de *S. aureus*, usualmente en múltiples copias ó en elementos móviles como plásmidos o casete cromosomal. Las transposones contienen genes de resistencia a antibióticos como tetraciclina, trimetropin, aminoglicósidos y vancomicina.

Figura 4. Estructura de los elementos genéticos móviles encontrados en el genoma de la cepa USA300 (FR3757).



Fuente: Tomada y modificada (Malachowa and DeLeo 2010).

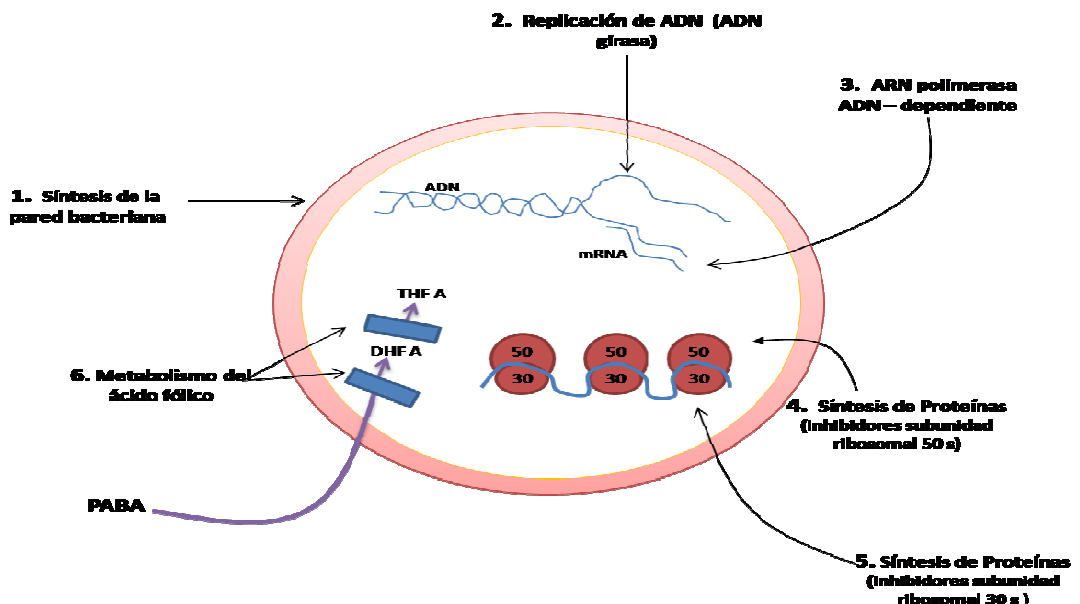
3. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *S. aureus*

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por ciertos microorganismos para inhibir el crecimiento o matar otros microorganismos. En la terapéutica son utilizados como fármacos para controlar y eliminar infecciones bacterianas, ya que su blanco se encuentra solamente en este tipo de células.

3.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos pueden ser bacteriostáticos, es decir que inhiben de forma temporal el crecimiento bacteriano o bactericidas que destruyen la célula bacteriana y pueden ejercer su acción mediante los siguientes procesos: 1) Inhibición de la síntesis de la pared celular, 2) Inhibición de la síntesis proteica y 3) Bloqueo de la síntesis de ácidos nucleicos (Figura 5).

Figura 5. Sitios de acción de los antibióticos.



3.1.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular

Dentro de este grupo se encuentran los betalactámicos y los glicopéptidos, dos familias de antibióticos ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* y SARM. Estos antibióticos inhiben la síntesis de la pared celular bloqueando en diferentes niveles la producción de peptidoglicano.

El mecanismo de acción de los betalactámicos está dado por su unión a las proteínas de unión a la penicilina, “penicillin binding proteins” ó PBPs que se encuentran en la parte externa de la membrana plasmática. Esta unión PBP- β -lactámico, inhibe la transpeptidación en la formación del peptidoglicano, enlace necesario para la síntesis de peptidoglicano dejando la pared debilitada y la célula es lisada por presión osmótica (Marin and Gudiol 2003). Los glicopéptidos también inhiben la transpeptidación pero a diferencia de los betalactámicos se unen a los residuos C-terminal D-Ala-D-Ala, bloqueando la transpeptidación y evitando la incorporación de monómeros al asociarse con los residuos D-Ala-D-Ala en los monómeros precursores (Barna and Williams 1984).

3.1.2 Inhibición de la síntesis proteica

La inhibición de la síntesis proteica se da por el bloqueo de la elongación del péptido mediante la asociación del antibiótico con la subunidad 30S o 50S del ribosoma. Algunos de los antibióticos que actúan de esta manera son las estreptograminas, tetraciclinas macrólidos, lincosamidas, estos dos últimos con un efecto bacteriostático (Vasquez 1974).

3.1.3 Bloqueo de la síntesis de ácidos nucleicos

Las quinolonas inhiben la síntesis de ácidos nucleicos por inhibición de la topoisomerasa IV y la ADN girasa, el mecanismo de acción consiste en crear un

complejo quinolona-enzima-ADN que bloquea la acción de la enzima, inhibe la síntesis de proteínas e induce muerte celular (Hooper 1999; Hooper 2001).

El trimetropin también inhibe la síntesis de proteínas pero a nivel de los precursores ya que bloquea la síntesis de tetrahidrofolato, indispensable en la síntesis de monofosfato de timidina (dTMP).

3.2 HISTORIA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *S. aureus*

S. aureus fue el primer microorganismo en el cual se detectó resistencia a los antimicrobianos, desarrollando múltiples mecanismos tanto innatos como adquiridos. *S. aureus* ha generado resistencia a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de estas infecciones, con lo cual la terapéutica es cada vez más compleja y limitada a un número reducido de antimicrobianos (Figura 6).

El primer antibiótico utilizado en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* fue la penicilina. Antes de la introducción de la penicilina la mortalidad en este tipo de infecciones se estimaba en un 80%, representando un problema de salud pública a nivel mundial (Alexander and Hudson 2001; Deurenberg and Stobberingh 2008). En 1942 la penicilina empezó a utilizarse a nivel mundial en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* y sólo dos años después de su implementación, se aisló la primera cepa hospitalaria resistente y productora de betalactamasas, con detección posterior a nivel comunitario (Deurenberg and Stobberingh 2008). Concomitante a la resistencia a penicilina, durante la década de los años 50 se diseminaron cepas resistentes a otros antibióticos introducidos recientemente como estreptomina, cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina (Williams 1959).

En 1960 los aislamientos de *S. aureus* resistentes a penicilina alcanzaban el 80%, sin embargo la introducción de antibióticos β -lactámicos, estables frente a betalactamasas como algunas cefalosporinas y posteriormente en 1961, de

antibióticos β -lactámicos semisintéticos como meticilina solucionaron momentáneamente el problema de resistencia. Dos años después de la introducción de la meticilina las cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina desarrollaron también resistencia a meticilina (SARM) por la adquisición del gen *mecA*, que codifica para una proteína de unión a penicilina, PBP2-a (Penicillin-binding Proteins-2a), con baja afinidad por meticilina, inhibiendo por lo tanto el efecto inhibitorio de la meticilina durante el proceso de división celular (Memmi, et al. 2008).

Actualmente los glicopéptidos han sido utilizados en el tratamiento de infecciones por SARM, este grupo de antibióticos fueron introducido en 1958 y durante mucho tiempo representaron una opción para el control de este microorganismo, sin embargo el aislamiento en 1980 de enterococos resistentes y de estafilococos coagulasa negativos con susceptibilidad disminuída a vancomicina (Schwalbe, et al. 1987), llamó la atención sobre la posible aparición de resistencia a glicopéptidos por *S. aureus*. Fue solo hasta 1997 cuando se reportó en Japón, la primera cepa de *S. aureus* con susceptibilidad disminuída presentando una concentración inhibitoria mínima (CIM) para la vancomicina de 8 $\mu\text{g/ml}$ (Hiramatsu, et al. 1997) y en 2002 se registró el primer aislamiento en Estados Unidos, con una CIM $>32 \mu\text{g/ml}$ (CDC 2002).

3.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

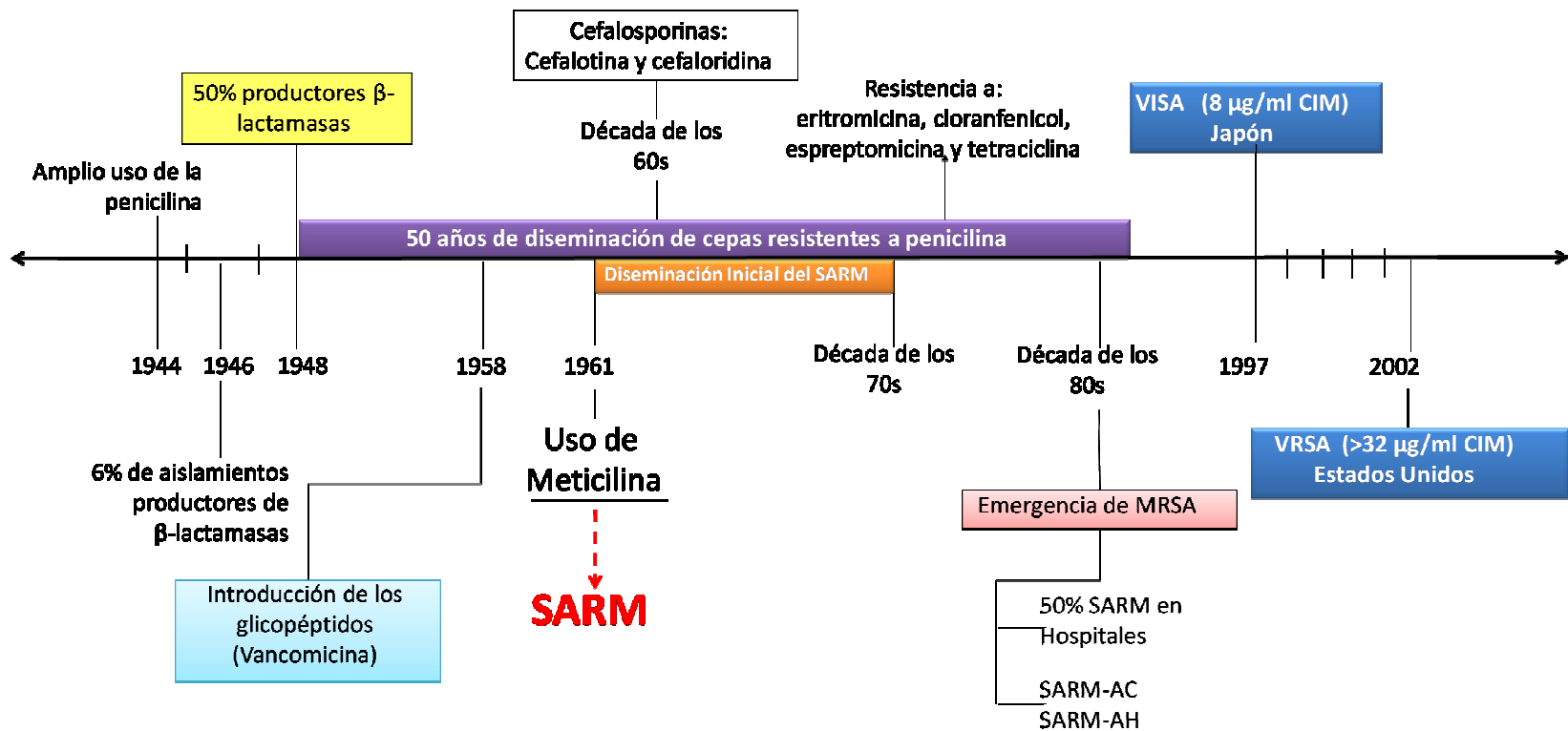
S. aureus posee diversos mecanismos de resistencia a antibióticos dentro de los cuales se encuentra la alteración del blanco, prevención de acceso al blanco, inactivación del antibiótico y generación de mutaciones puntuales, estos mecanismos pueden ser innatos de *S. aureus* o adquiridos mediante transferencia genética.

3.3.1 Resistencia a betalactámicos

Los betalactámicos son un grupo de antibióticos dentro de los cuales se encuentran diferentes clases de penicilinas, monobactanes, cefalosporinas, carbapenes e inhibidores de β -lactamasas. Las penicilinas pueden ser de origen natural y sintético, presentan como núcleo común el ácido 6-aminopenicilínico que posee una cadena lateral en la posición 6 que varía entre las diferentes penicilinas y define sus capacidades farmacocinéticas (Figura 7) (Marin and Gudiol 2003).

Estos antibióticos ejercen un efecto bactericida por la inhibición de la síntesis de la pared mediante la unión a las proteínas de unión a penicilina (PBPs), bloqueando la transpeptidación entre las cadenas de peptidoglicano. La resistencia frente a estos antimicrobianos se debe a la producción de una β -lactamasa o penicilasa que hidroliza el anillo β -lactámico del antibiótico produciendo su inactivación (Marin and Gudiol 2003).

Figura 6. Evolución de la resistencia antimicrobiana en *S. aureus*.



SARM: *S. aureus* resistente a meticilina, SARM-AC: SARM-Adquirido en comunidad, SARM: SARM-Adquirido en hospital, VISA: *S. aureus* con susceptibilidad intermedia a vancomicina, VRSA: *S. aureus* resistente a vancomicina.

Esta β -lactamasa es una enzima extracelular codificada por el gen *blaZ* bajo el control de dos genes reguladores *blaR1* y *blaI* que codifican para las proteínas BlaR1 y Blal respectivamente (Gregory, et al. 1997; Zhang, et al. 2001). En presencia de antibióticos β -lactámicos la proteína BlaR1 sufre un clivaje autocatalítico, la subunidad que es liberada posee función de metaloproteasa y cliva la proteína represora Blal que se encuentra asociada con el sitio promotor del gen *blaZ*, liberándolo para realizar la transcripción y traducción de la proteína, que será liberada al espacio extracelular donde ejercerá su actividad de hidrolasa frente a antibióticos β -lactámicos. Estos genes están presentes en el transposón Tn552 que es normalmente portado por un grupo diverso de plásmidos, denominados plásmidos de resistencia a β -lactámicos/metales pesados, como el pI524, pSK23 y pI258 (Hou, et al. 2007; Kaase, et al. 2008).

S. aureus tiene un segundo mecanismo de resistencia a β -lactámicos en el cual se encuentra implicado otro determinante genético (gen *mecA*) y será tratado en la sección 3.4.

3.3.2 Resistencia a vancomicina

Durante los últimos 40 años la vancomicina ha sido el pilar central en el tratamiento de las infecciones por SARM, pero su uso excesivo e indiscriminado ha llevado al surgimiento de cepas con sensibilidad intermedia y cepas resistentes frente a este antibiótico. El blanco de la vancomicina son las terminaciones D-Ala-D-Ala en los monómeros de peptidoglicano que sirven como precursores en la síntesis de pared celular (McManus 1997).

Las cepas con sensibilidad intermedia a vancomicina (*vancomycin-intermediate S. aureus*, VISA) fueron reportadas inicialmente en Japón, presentando una CIM de 8 μ g/ml. Posteriormente fueron reportados aislamientos de este tipo en Europa, Estados Unidos, Asia y Brasil, aislamientos que presentaron CIM entre 8-16 μ g/ml

(Bierbaum, et al. 1999; Hiramatsu, et al. 1997; Ploy, et al. 1998). La reducción de la susceptibilidad se debe a un mecanismo intrínseco en el que se da un cambio en la biosíntesis del peptidoglicano. Las cepas VISA poseen muchas más capas de peptidoglicano en la pared bacteriana en comparación con las cepas susceptibles, también hay disminución en el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano produciendo la exposición de un mayor número de residuos D-Ala-D-Ala (Hanaki, et al. 1998). Es así como la vancomicina debe atravesar una pared de mayor grosor y evadir la unión con el exceso de residuos D-Ala-D-Ala en las primeras capas del peptidoglicano, para poder acceder a su blanco que son los monómeros de peptidoglicano. El mecanismo molecular que influencia la variación en la biosíntesis del peptidoglicano es desconocido.

Contrario a la frecuencia con la cual se han detectado las cepas VISA a nivel mundial, la resistencia a vancomicina (*vancomycin-resistant S. aureus*, VRSA) es escasa. El VRSA presenta una CIM >32 ug/ml. El mecanismo molecular de resistencia a vancomicina está dado por la modificación de los residuos D-Ala-D-Ala, generando un blanco molecular con una afinidad 1000 veces menor por la vancomicina (Gonzalez-Zorn and Courvalin 2003). La modificación del blanco está determinada por la adquisición del operón *vanA*, originariamente detectado en *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina. El operón *vanA* está constituido por siete genes: *vanR* y *vanS*, genes encargados de la regulación; *vanH*, *vanA* y *vanX*, indispensables para la resistencia a glicopéptidos y dos genes accesorios *vanY* y *vanZ*. El gen *vanH* y *vanA* codifican una deshidrogenasa y una ligasa respectivamente, encargadas de la síntesis de los residuos D-Ala-D-Lactato. El gen *vanX* codifica una D,D- dipeptidasa que destruye los dipéptidos D-Ala-D-Ala en los precursores de la pared, para que la D,D-carboxipeptidasa remueva el residuo D-Ala restante del extremo carboxilo terminal (Walsh 1993). El operón *vanA* es transportado por el transposon (Weigel, et al. 2003) TN1546 (Tenover, et al. 2004).

3.3.3 Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas

Aunque los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS) poseen características químicas y estructurales diferentes se encuentran asociados en un mismo grupo de antibióticos, ya que comparten su mecanismo de acción y de resistencia generado por *S. aureus*. Los MLS inhiben la síntesis proteica por la unión a la subunidad ribosomal 50S produciendo la disociación del complejo ARN de transferencia y el sitio peptidil, bloqueando la elongación del péptido (Mensa, et al. 2003). Frente a este grupo de antibióticos *S. aureus* utiliza diferentes mecanismos de resistencia:

- A. Modificación del blanco: la resistencia resulta por la N6-dimetilación en un residuo de alanina en el ARN ribosomal 23S que causa una disminución en la afinidad por el antibiótico. Las bases moleculares de resistencia por modificación del blanco están dadas por los genes *erm* (A, B y C) que codifican para una metilasa de ARNr. Los genes *ermA* y *ermB* se encuentran localizados en los transposones Tn554 y Tn551 respectivamente y se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano, por su parte el gen *ermC* está localizado en el plásmido pMS97 (Matsuoka, et al. 1998).
- B. Expulsión del antibiótico: los genes *mrsA* y *mrsB* codifican para bombas de eflujo que se encargan de la expulsión del antibiótico desde el citoplasma al espacio extracelular impidiendo la interacción con su sitio blanco (Ross, et al. 1990).
- C. Inactivación del antibiótico: la estreptogramina B puede ser inactivada por una hidrolasa codificada por el gen *vatA* y *vatB* (Lowy 2003).

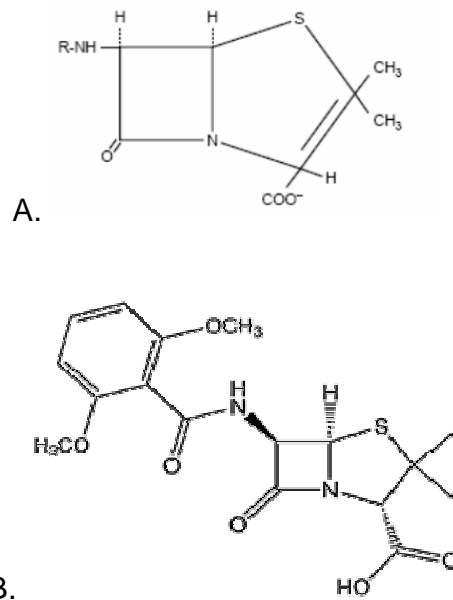
3.3.4 Resistencia a quinolonas

Las quinolonas son antibióticos sintéticos que ejercen un efecto bactericida mediante la inhibición de la síntesis de ADN, específicamente se unen a dos enzimas implicadas en la síntesis de ácidos nucleicos, la ADN girasa y topoisomerasa IV (Hooper 2001). Estas enzimas están constituidas por dos subunidades A y dos B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* y *griA* y *griB*, respectivamente, conformando una molécula tetramérica. La resistencia a estos antibióticos está dada por la generación de mutaciones puntuales a nivel del ADN en los genes que codifican las subunidades, ocasionando un cambio en el aminoácido que se encuentra en la zona de interacción de la quinolona, lo que disminuye la afinidad por el antibiótico. La adquisición de la resistencia es gradual y está relacionada con el número de mutaciones no sinónimas que se presentan en la región determinante de resistencia a quinolonas (RDRQ).

3.4 RESISTENCIA A METICILINA

A diferencia de la penicilina, la meticilina es un β -lactámico semisintético resistente al clivaje por acción de penicilinasas, debido a una modificación de la estructura del ácido 6-aminopenicilínico por la adición de diferentes cadenas laterales que generan una tensión en la molécula (Figura 7), evitando el clivaje por incompatibilidad espacial entre la penicilinasas y el antibiótico (Lowy 2003).

Figura 7. Estructura química del ácido 6-aminopenicilínico y la metilicina



(A) Acido 6-aminopenicilínico (penicilina). (B) metilicina. 1: anillo β -lactámico, 2: anillo de tiazodialina y R: cadena lateral.

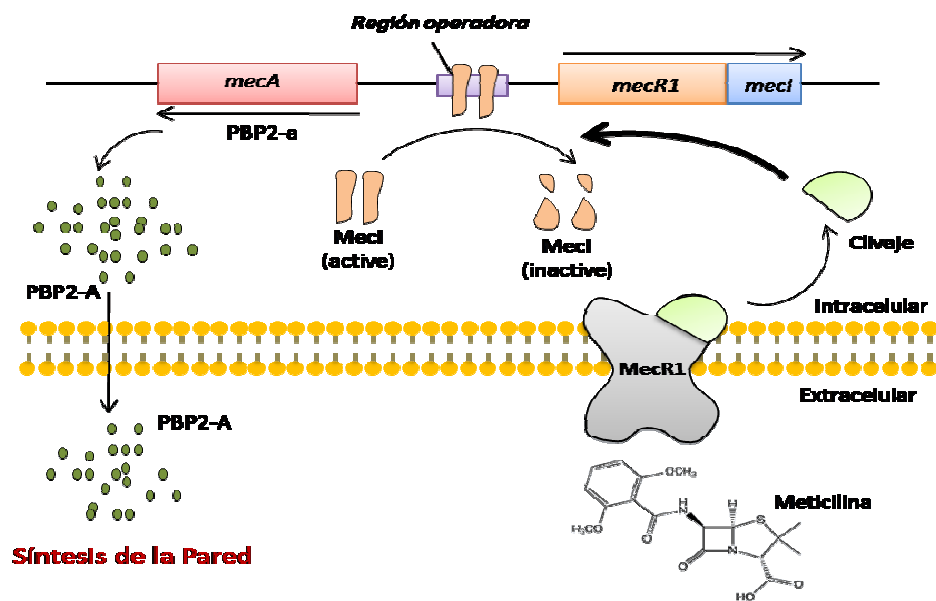
El mecanismo de resistencia requiere la adquisición del gen *mecA* responsable de la síntesis de una proteína de unión a penicilina modificada PBP2a que cataliza la misma reacción de los demás tipos de PBPs. En presencia de metilicina la PBP2a es capaz de realizar la transpeptidación entre las cadenas de peptidoglicano permitiendo la división celular. La razón por la cual la PBP2a no es inactivada por el antibiótico está dada por una modificación en el sitio de unión que genera disminución de la afinidad por el antibiótico. La presencia de la PBP2a, adicional a la resistencia a metilicina, genera resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos.

3.4.1 Gen *mecA* y SCC*mec*

El gen *mecA* es el determinante de resistencia a metilicina, se encuentra localizado en el cromosoma bacteriano y codifica para la PBP2a. Similar al

mecanismo de resistencia presentado por el gen blaZ, el gen mecA está asociado a un complejo regulatorio constituido por los genes mecR1 y mecl que codifican para la proteína MecR1 y Mecl (Archer and Bosilevac 2001). En presencia de meticilina la proteína transmembranal detecta el antibiótico y sufre un clivaje autocatalítico en su porción citoplasmática, liberando una subunidad que presenta actividad de metaloproteasa, la cual degrada el inhibidor que se encuentra asociado al promotor del gen mecA, respectivamente, permitiendo la transcripción y traducción de la PBP2a que será transportada a la membrana celular para cumplir su función en la síntesis de la pared celular (Archer and Bosilevac 2001; Hiramatsu, et al. 2001; Zhang, et al. 2001) (Figura 8).

Figura 8. Inducción de la síntesis de PBP2-a en presencia de meticilina.



La proteína represora Mecl se asocia con el ADN en la región operadora bloqueando la transcripción de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecl*, en ausencia del antibiótico la producción de PBP2-a se da en bajas concentraciones. La unión de la meticilina a la proteína MecR1, un sensor transmembranal que se cliva autocatalíticamente y el fragmento liberado constituyen una metaloproteína que degrada a la proteína represora Mecl, activándose la transcripción y por consiguiente la traducción de PBP2-a. Una vez en el citoplasma, PBP2-a atraviesa la membrana celular y supe la función de transpeptidación en el proceso de síntesis de la pared bacteriana.
Fuente: Tomado y modificado de Lowy 2010.

El gen *mecA* forma parte de una estructura de casete dentro del cromosoma de *S. aureus* denominado SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome mec) (Katayama, et al. 2000). SCCmec es un elemento genético móvil de gran tamaño que se inserta específicamente hacia la parte 3' de un marco de lectura abierto (ORF) de función desconocida denominado *orfX* (Ito, et al. 1999). Su movilidad se debe a la presencia de los genes *ccrAB* y *ccrC* que codifican las enzimas recombinasas del casete, encargadas de la integración y escisión cromosómica de SCCmec. Adicionalmente, SCCmec puede portar genes de resistencia a otros antibióticos ubicados en las regiones entre los genes de las recombinasas y *mecA*, o regiones J (junkyard) (Hiramatsu, et al. 2001; Katayama, et al. 2001).

Basándose en la organización de *mec* (genes *mecA*, *mecR* y *mecI*) y de genes asociados, se han diferenciado cuatro clases de complejo *mec* (A-E), de los cuales los complejos A, B y C son los más frecuentes en *S. aureus* (Chongtrakool, et al. 2006). El complejo *mec* clase A es el único complejo que contiene el complejo regulatorio completo *mec1-mecR1-mecA*, ya que en B y C el complejo regulatorio presenta secuencias de inserción que cambian la disposición de estos genes. La clase B está constituida por IS1272- Δ *mecR1-mecA* y la clase C presenta IS431- Δ *mecR1-mecA* (Ito, et al. 2003). Adicionalmente de las clases de complejo *mec* se han descrito cuatro diferentes alotipos (1-4) definidos por el tipo de *ccr* portado (*ccrA1B1*, *ccrA2B2*, *ccrA3B3*, *ccrA4B4* y *ccrC*). La combinación de la clase de complejo *mec* y el alotipo de *ccr* ha permitido clasificar el SCCmec en ocho tipos (I-VIII) (Tabla 2). El número en romano indica el orden en que fueron reportados. Para mayor información el tipo de SCCmec debe ir seguido del tipo de complejo *ccr* y la clase de *mec* entre paréntesis, con lo cual se designará como SCCmec tipo I (2A), tipo II (2A), tipo III (3A), tipo IV (2B), tipo V (5C2), tipo VI (4B), tipo VII (5C1), y tipo VIII (4A) (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements 2009).

Tabla 2. Tipos de SCCmec identificados en *S. aureus*

Tipo de SCCmec	Complejo <i>ccr</i> ¹	Clase <i>mecA</i>
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4)	A

¹ El complejo de genes se indica entre parenthesis

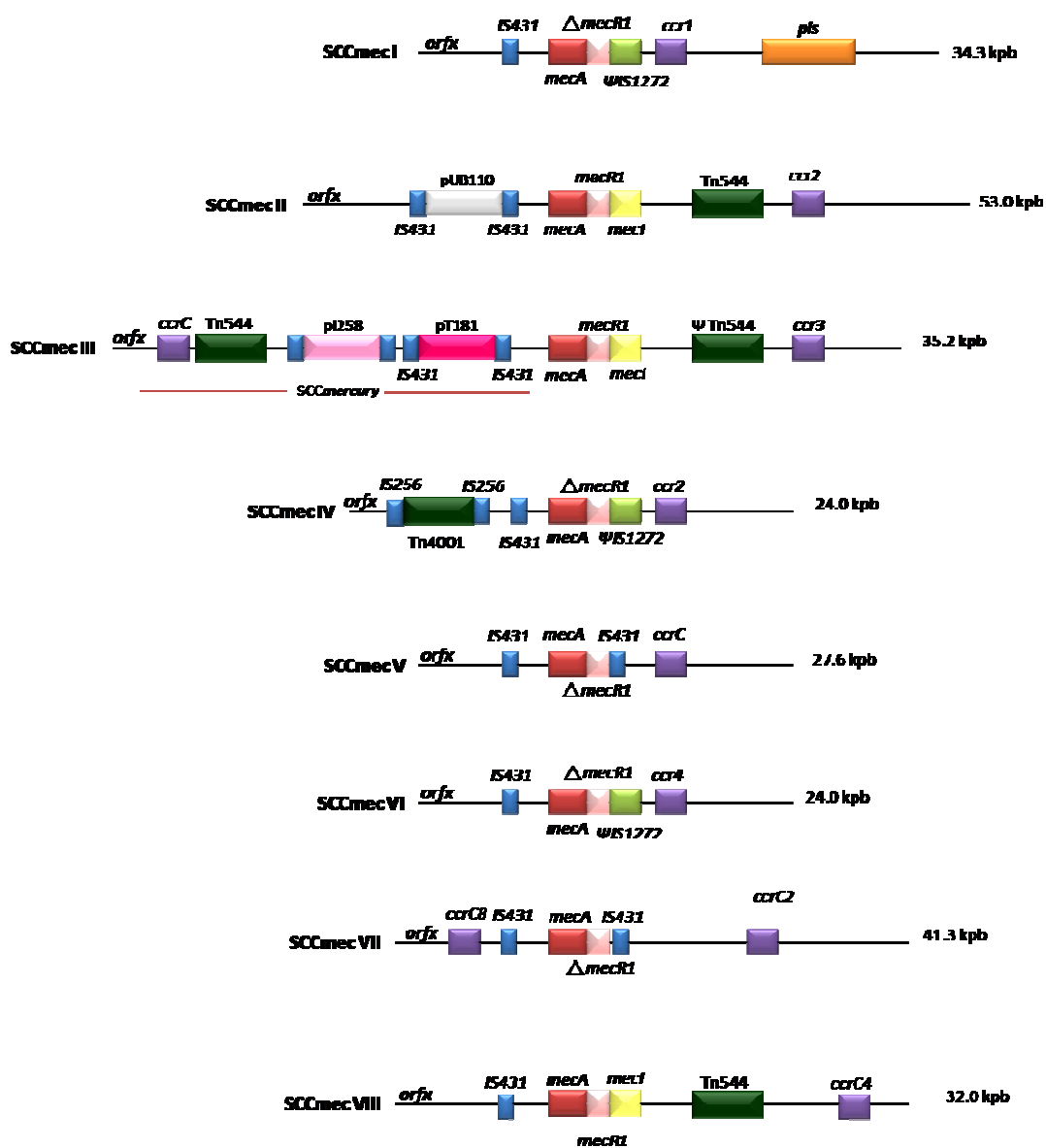
Fuente: Tomado de (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements 2009)

Diferencias estructurales y en composición génica de las regiones J han sido identificadas en los tipos de SCCmec más frecuentes. Cada tipo de SCCmec puede ser clasificado con una mayor discriminación en subtipos basado en los polimorfismos o variaciones de las regiones J (Figura 9) (Kwon, et al. 2005).

- SCCmec tipo I (1B): está compuesto por el complejo *ccr* tipo 1 y la clase B del complejo *mec*, tiene un tamaño de 34 Kb. Posee la secuencia de inserción IS431 ubicada en la región J1. No porta genes de resistencia adicionales.
- SCCmec tipo II: tiene un tamaño de 54 Kb y está constituido por el complejo *ccr* tipo 2 y el *mec* clase A, la secuencia de inserción IS431, el plásmido pUB110 y el transposon Tn554. pUB110 porta los determinantes de resistencia *aadD* y *ble* que confieren el fenotipo de resistencia frente a kanamicina y bleomicina respectivamente.

- SCCmec tipo III: es el de mayor tamaño con 67 Kb porque adicional al SCCmec porta otro casete cromosomal denominado SCCHg, que confiere resistencia a metales pesados como mercurio. El SCCmec III está constituido por *ccr* tipo 3, *mec* clase A y porta el transposon Tn554, los plásmidos pT181 y pI256 y las secuencias de inserción IS431 e IS656. Adicionalmente tiene una copia incompleta de un gen *ccr* entre dos elementos IS431. El Tn554 porta los determinantes de resistencia a espectinomicina y al grupo de MLS, genes *spc* y *ermA* respectivamente y el pT181 confiere resistencia a tetraciclina (*tet-K*).
- SCCmec tipo IV: es el casete más pequeño de 21-24Kb por ello tiene una mayor movilidad entre *S. aureus*. Compuesto por el *ccr* tipo 2 y el complejo *mec* clase B, porta la secuencia de inserción IS1272 y no tiene genes de resistencia adicional ni factores de virulencia.

Figura 9. Comparación de los tipos de SCCmec encontrados en *S. aureus*.



El complejo *mecA* clase A está constituido por la región génica reguladora completa (*mec1-mecR1-mecA*). El clase B y C contienen genes regulatorios que tienen una IS: IS1272- Δ *mecR1-mecA* y IS431-*mecA*- Δ *mecR1*-IS431, respectivamente, el Tn544 porta genes de resistencia adicionales al *mecA*, *ermA* y *aad9* o *spc* que confieren el fenotipo de resistencia a eritromicina y estreptomicina/espectinomicina. El Tn4001 contiene el gen *aacA-aphD* que confiere resistencia a aminoglicósidos, el plásmido pT181 de resistencia a tetraciclina (*tet*), Tn544 de resistencia al cadmio (*cadB* y *cadC*) y el plásmido pUB110 a bleomicina (*ble*) y tobramicina (*ant40*). Fuente: Tomada y modificada referencia (Malachowa and DeLeo 2010).

- SCCmec tipo V (5C2): tiene 25 Kb, constituido por *ccrC*, *mec* clase C2 (IS431-*mecA*- Δ *mecR1*- IS431) y un sistema de restricción-modificación (RM) tipo 1 (*hsdR*, *hsdM* y *hsdS*).
- SCCmec tipo VI (4B): de 24 Kb porta *ccr* tipo 4, *mec* clase B. No porta genes accesorios. Inicialmente fue clasificado como SCCmec tipo IV.
- SCCmec tipo VII (5C1): de 41.3 Kb, porta el complejo *ccrC* y *mec* clase C1 (IS431-*mecA*- Δ *mecR1*-IS431).
- SCCmec tipo VIII (4A): de 32 Kb, porta *mec* clase A, el complejo *ccr* tipo 4 y en J2 el transposon Tn554 que tiene determinantes de resistencia a espectinomicina y al grupo de MLS.

4. SARM

4.1 EPIDEMIOLOGÍA DE SARM

La meticilina fue el primer antibiótico β -lactámico semisintético utilizado en el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* resistente a penicilina ya que permanece estable y biológicamente activo en presencia de β -lactamasas. La meticilina se introdujo al mercado Europeo en 1959 y tan solo un año después de iniciar su comercialización en Inglaterra fueron aisladas las primeras cepas SARM y en 1963 se describió el primer brote epidémico de infección nosocomial por SARM en el Reino Unido (Stewart and Holt 1963).

Durante los años siguientes, aislamientos de SARM fueron detectados en otros países de Europa y en la década de los 70s ya se informa un incremento de estos aislamientos causando infección nosocomial en el Reino Unido, Dinamarca, Francia y Suiza (Benner and Kayser 1968; Chabbert and Baudens 1962; Parker and Hewitt 1970; Rosendal, et al. 1976) y su detección en países donde el tratamiento con antibióticos β -lactámicos semisintéticos (estables frente a β -lactamasas) no habían sido implementados (Polonia, India y Turquía) y en otros países del mundo como Australia, Japón y Estados Unidos (Rountree and Beard 1968).

La rápida diseminación de SARM fue favorecida por el uso indiscriminado de antibióticos que ejercieron presión selectiva sobre cepas heteroresistentes y la falta de programas de control en centros hospitalarios. Sin embargo, a finales de los años 70s se observó una disminución en el número de aislamientos de SARM, las razones que originaron este descenso son desconocidas, aunque la incursión de un esquema de tratamiento antibiótico razonable y una mejora en la práctica médica posiblemente contribuyeron a esta disminución (Ayliffe 1997).

A mediados de la década de los 80 en Australia, Estados Unidos e Irlanda emergieron nuevas cepas de SARM, así como reportes de infecciones esporádicas en otros países y en 1981 se identifica en Londres, una cepa epidémica conocida como EMRSA-1 (Epidemic Methicillin Resistant *S. aureus*), la cual portaba un fago y un perfil de resistencia a antibióticos similar a una cepa epidémica descrita en Australia. EMRSA-1 se diseminó desde Londres hacia el sur de Inglaterra y fueron descritas inicialmente 16 cepas epidémicas más en este país (EMRSA-1 a EMRSA-16) (Cookson and Phillips 1988).

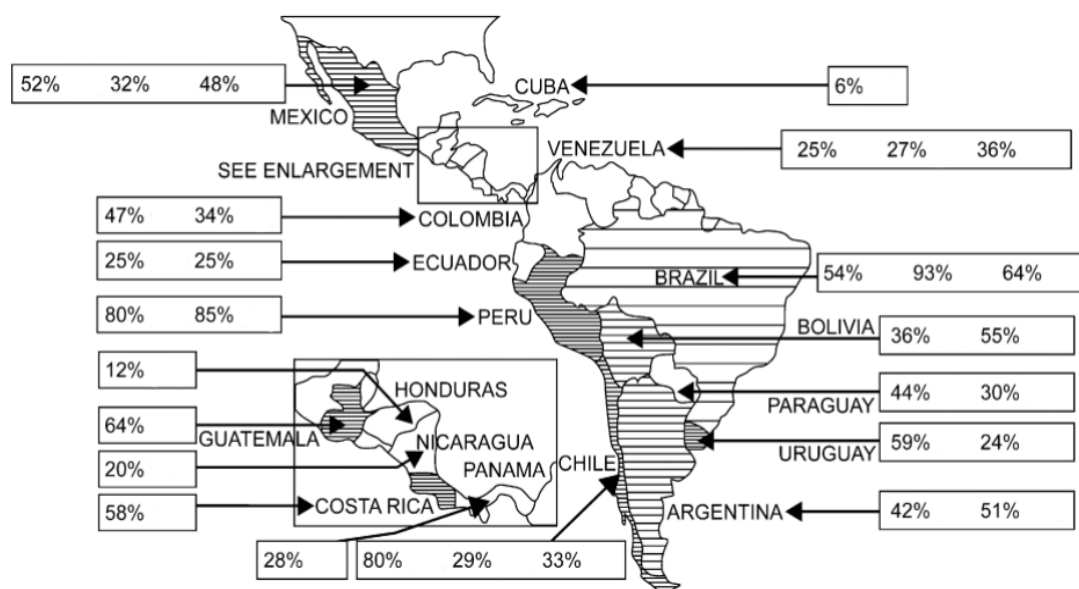
En Estados Unidos los aislamientos de SARM aumentaron progresivamente desde 2,4% en 1975 hasta 29% en 1991. Panoramas similares se observaron en Europa donde su frecuencia incrementó desde <1% en 1980 hasta un 30% en 1991, presentándose prevalencias altas (30%) en países del sur como Italia, Grecia, Francia y España mientras que Holanda y Dinamarca reportaban prevalencias de infección más bajas (6%) (Voss, et al. 1994; Westh, et al. 1992).

El programa de vigilancia epidemiológica SENTRY reportó la prevalencia de SARM en hospitales de países en todo el mundo durante el periodo de 1997 a 1999, siendo para esa fecha en Estados Unidos del 34,2%, en Canadá del 5,7%, en América Latina del 34,9% y en Europa del 26,3%. Durante el periodo de 1998-1999 en Sudáfrica la prevalencia fue del 40,4%, en Japón del 66,8% y en Australia del 22,4% (Bell and Turnidge 2002).

En América Latina las infecciones por SARM en hospitales son un problema creciente. Información recopilada por la Organización Panamericana de Salud (PAHO Pan American Health Organization) durante el año 2004 reportó prevalencias de infección por SARM en hospitales de Argentina 42% (n = 5851 aislamientos); Bolivia 36% (n = 1167); Chile 80% (n = 246); Colombia 47% (n = 4214); Costa Rica 58% (n = 674); Cuba 6% (n = 80); Ecuador 25% (n = 1363); Guatemala 64% (n = 1483); Honduras 12% (n = 393); México 52% (n = 497);

Nicaragua 20% (n = 296); Paraguay 44% (n = 980); Perú 80% (n = 1407); Uruguay 59% (n = 1431) y Venezuela 25% (n = 2114) (PanAmericanHealthOrganization 2004). Para el año 2006 datos similares fueron reportados en la Asociación Panamericana de Enfermedades Infecciosas mostrando tasas de infección nosocomial por SARM en Argentina 51%; Bolivia 55%; Brazil 54%; Chile 29%; Ecuador 25%; Mexico 32%; Panamá 28%; Paraguay 30%; Uruguay 24% y Venezuela 27% (Figura 10)

Figura 10. Porcentaje de aislamientos de SARM en estudios realizados en países de América Latina.



En los países sombreados se han detectado prevalencias >50% de SARM por lo menos en un reporte. Fuente: Tomada y modificada (Guzman-Blanco, et al. 2009))

En Brasil, la frecuencia de aislamiento de *S. aureus* en hospitales es mayor que en otros países; en el hospital de São Paulo el 19% de las infecciones son causadas por este patógeno y de estos aislamientos el 60% son SARM. Sin embargo se reportan prevalencias de SARM que varían en las diferentes áreas geográficas del

país y el tipo de muestra del cual son obtenidos (Loureiro MM 2002). En Perú fue reportado SARM como agente causal del 85% de las infecciones nosocomiales en el 2002 en un hospital universitario en la ciudad de Lima (Seas, et al. 2006). Prevalencias de infección nosocomial por SARM han sido reportadas igualmente en México (48%), Venezuela (36%) y Chile (33%) (Otth, et al. 2008).

En Colombia, reportes realizados por la red de vigilancia de resistencia antimicrobiana han revelado que la prevalencia de SARM ha sido del 38% en 2001, 46% en 2002, 45% en 2003 y 2004, 38% en 2005 y 34% en 2006, sin embargo en diferentes localidades de Colombia se reportan prevalencias de infección variables desde 42% en Montería, 50% en Bucaramanga (Toscano, et al. 2009) y mayores de 60% en el departamento del Valle (Jaramillo 1996).

4.2 CLONES EPIDÉMICOS Y EVOLUCIÓN

Algunas cepas de SARM son denominadas cepas epidémicas, SARM epidémico o EMRSA (del inglés Epidemic Methicillin Resistant *S. aureus*) debido a que poseen la capacidad de producir brotes hospitalarios en un tiempo corto, en hospitales geográficamente distantes y se mantiene en dichos centros durante un periodo de varios años.

En un estudio realizado por Oliveira et al, publicado en 2001 se realizó la tipificación de 3067 cepas de SARM por electroforesis en campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) y un grupo representativo de cepas fueron analizadas por Multilocus sequence Typing (MLST), tipificación de SCCmec y gen spa. De las cepas analizadas por MLST el 68% se agruparon en 5 clones que fueron definidos por estos autores como pandémicos (Oliveira, et al. 2001). En estudios similares como el realizado por Enright utilizando una colección de 359 SARM fueron identificados 5 complejos clonales mayores (CC) (CC5, CC8, CC22, CC45 y CC30) en los cuales se agrupaban la mayoría de cepas y 5 clones

predominantes que tenían el mismo tipo de secuencia (sequence type, ST) y el mismo SCCmec (Enright, et al. 2000). Estos clones se denominaron clon Ibérico, Brasileño, Húngaro, Nueva York/Japón y Pediátrico.

El clon Ibérico fue detectado en 1989 en Barcelona causando un brote en un hospital universitario (Dominguez, et al. 1994), se diseminó siendo detectado en otros países como Francia, Bélgica (Deplano, et al. 2000), Portugal (Sanches, et al. 1995), Escocia, Italia (Mato, et al. 1998), Holanda, Alemania, República Checa, Polonia, Suecia, Estados Unidos (Roberts, et al. 1998b) y Colombia (Cruz, et al. 2005). Este clon es identificado con el perfil alélico 3-3-1-12-4-4-16 correspondiente al ST247 y porta SCCmec tipo IA, según la nomenclatura estándar ST247-SARM-IA.

El clon Brasileño (ST239-SARM-IIIA) fue descrito en 1992 en Brasil (Teixeira, et al. 1995). Este clon se ha extendido a los países de Sur América como Argentina (Corso, et al. 1998), Uruguay, Chile, Paraguay, Colombia y países de Europa como Portugal (Oliveira, et al. 1998), República Checa, Grecia, Finlandia, Alemania, Irlanda, Holanda, Polonia, Suecia y el Reino Unido (Enright, et al. 2002) y en países de Asia como India (Arakere, et al. 2005).

El clon Húngaro (ST239-SARM-III) se ha expandido en este país desde 1993 (de Lencastre, et al. 1997) e inicialmente se diseminó a Taiwán, China (Aires de Sousa, et al. 2003) , India (Arakere, et al. 2005) y Brasil (Vivoni, et al. 2006).

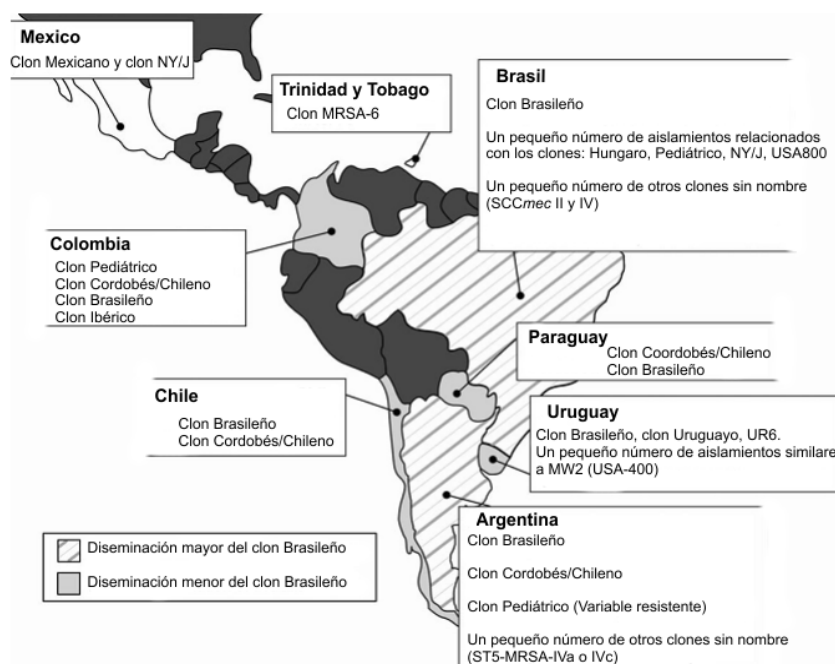
El clon Nueva York/Japón (ST5-SARM-II) fue identificado en Nueva York (Roberts, et al. 1998a), Nueva Jersey y Pensilvania (Roberts, et al. 2000), en Canadá, Florida y en un hospital de Tokio. Igualmente ha sido detectado en Europa, Finlandia, Irlanda y Reino Unido (Enright, et al. 2002) y recientemente en México (Velazquez-Meza, et al. 2004) y Brasil (Melo, et al. 2004).

El clon Pediátrico (ST5-SARM-IV) fue descrito en 1992 en un hospital pediátrico de Portugal (Sa-Leao, et al. 1999) y posteriormente se ha encontrado en Polonia, Estados Unidos (Roberts, et al. 1998a), Argentina (Corso, et al. 1998), Colombia (Gomes, et al. 2001), Francia, Reino Unido (Enright, et al. 2002) y España (Perez-Roth, et al. 2004).

Con el fin de explicar el origen de estos clones de SARM se han realizado estudios comparativos entre los primeros y los últimos aislados e inicialmente se postularon dos hipótesis. La primera sugiere que los SARM descenden de un mismo ancestro común que adquiere una sola vez el SCCmec. Sin embargo, la segunda hipótesis, basada en la evidencia de los análisis de tipificación molecular (MLST) que identifican diferentes SCCmec en un linaje particular, sugiere que los SARM adquieren varias veces diferentes tipos de SCCmec hasta que logran la estabilidad biológica (Deurenberg, et al. 2007).

Es así como por MLST el perfil alélico entre los clones Ibérico, Brasileño y Húngaro era muy similar, se diferenciaban máximo en dos loci, pero el SCCmec portado era diferente, el Ibérico portaba el SCCmec-I y el Brasileño y Húngaro SCCmec-III. Entre los clones Nueva York/Japón y Pediátrico el perfil alélico era idéntico, sin embargo portaban SCCmec distintos (SCCmec-II y SCCmec-IV respectivamente). Estos resultados demuestran que la adquisición del gen *mecA* sucedió en momentos evolutivos diferentes para cada uno de los clones. Adicional a la tipificación molecular estos clones han sido caracterizados fenotípicamente con lo cual su perfil de resistencia a antibióticos fue evaluado. Con excepción del clon Pediátrico que solo es resistente a aminoglucósidos, los demás clones presentan resistencia a múltiples grupos de antibióticos.

Figura 11. Distribución y diseminación de los clones de SARM en países de América Latina y el Caribe.



Los países con sombreado indican diseminación del clon Brasileño. En los países con sombreado gris oscuro no hay datos disponibles. Los clones subrayados representan clones con multiresistencia a fármacos. MW2 = clon relacionado con la cepa MW2; NY/J=relacionado con el clon NewYork/Japan; OSPC = clon Oceania Southwest Pacific; UR6 = Uruguayan community outbreak MRSA clone; WA1 =Western Australia 1 MRSA clone. Fuente: Tomado y modificado (Guzman-Blanco, et al. 2009)).

Otros clones reconocidos son EMRSA-15 y EMRSA-16, descritos inicialmente en brotes hospitalarios en el Reino Unido. Actualmente han sido detectados en otros países como Grecia, México, Canadá, Florida, Finlandia, Bélgica, Suecia, Dinamarca y España. El clon Cordobés/Chileno (ST5-MRSA-I) identificado en el 2002 en Argentina, también ha sido detectado en Chile, Paraguay y Colombia (Figura 11). La mayoría de los aislamientos del clon Cordobés/Chileno presentan

un fenotipo de multiresistencia a antibióticos. El clon USA-300 (ST8-SARM-IVa) identificado inicialmente causando brotes en la comunidad, fue aislado por primera vez en Estados Unidos y se diseminó rápidamente en Norte América (Moran, et al. 2006). USA-300 ha sido detectado en algunos países de Europa como Alemania, Reino Unido, Suiza y España, así como en Australia (Monecke, et al. 2008; Otter, et al. 2009) y en países de América Latina como Brasil, Costa Rica y Colombia (Ribeiro, et al. 2007)

4.3 SARM-CO Y SARM-H

Durante mucho tiempo las infecciones causadas por SARM estuvieron restringidas a hospitales y ocurrían en pacientes con factores de riesgo que favorecían la colonización o infección por SARM, como el consumo elevado de antibióticos, hospitalización prolongada (generalmente superior a 10 días), internalización en unidades de cuidados intensivos, edad avanzada, procedimientos quirúrgicos o invasivos (catéteres intravenosos, sondas urinarias, traqueotomía), enfermedades de base y el contacto con pacientes colonizados por SARM. Actualmente, SARM no solo se encuentra en hospitales (SARM-H) sino que también puede estar causando infecciones extrahospitalarias (comunitarias) (Skov, et al. 2012).

Los casos de infección por SARM en comunidad, están relacionados con una reciente hospitalización, con tratamiento antibiótico previo ó con un contacto con personas que han estado hospitalizadas recientemente. Los portadores nasales de *S. aureus* juegan un papel importante en la epidemiología y patogénesis de la enfermedad por SARM, actuando como reservorios de este microorganismo. Del 30% al 60% de los individuos pueden ser colonizados permanentemente por *S. aureus* en las fosas nasales y el 100% de la población ha sido portadora nasal en algún momento de su vida (van Belkum, et al. 2009). Los portadores nasales permanentes constituyen el principal reservorio de SARM adquirido en comunidad.

El primer brote de SARM adquirido en comunidad se describió en Detroit en 1980-81 y se caracterizó porque más de la mitad de los pacientes afectados eran consumidores de drogas por vía parenteral. Aunque el origen de este brote no se pudo identificar, se cree que el uso compartido de jeringas pudo ser la causa de la transmisión cruzada (Saravolatz, et al. 1982). Las primeras cepas de SARM adquirido en comunidad son aisladas a finales de 1990s, obtenidas de niños colonizados o con infecciones por SARM sin presentar factores de riesgo o relación con el ámbito hospitalario (Herold, et al. 1998).

El interés sobre SARM comunitario (SARM-CO) fue mucho mayor luego de la muerte de cuatro niños en Minesota y Dakota del norte causada por cepas de SARM comunitario, confirmando el peligro potencial de la adquisición de infecciones por SARM comunitario y la alta virulencia que poseen estas cepas ((CDC) 1999). Las infecciones por SARM-CO varían desde infecciones de piel y tejidos blandos hasta casos severos de neumonía necrotizante, fascitis necrotizante, tromboflebitis séptica y sepsis. Casos de bacteremia y síndrome de choque séptico por cepas de SARM-CO en UCI neonatal han sido descritos, destacando el hecho de que los microorganismos que circulan en la comunidad pueden llegar a causar infecciones serias y convertirse en un patógeno nosocomial.

La severidad en los cuadros clínicos observada en los casos de SARM-CO se ha relacionado con la presencia de factores de virulencia adicionales como PVL. A esta leucocidina se le asignó un papel determinante en infecciones por SARM en la comunidad y se encontró en el 77% de los aislamientos de SARM-CO. PLV se asocia principalmente a procesos inflamatorios de piel y tejidos blandos y neumonía necrotizante, debido a su actividad leucotóxica y dermonecrótica (Gillet, et al. 2002; Lina, et al. 1999).

Otros genes que han sido asociados con SARM-CO son los genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas el SCCmec tipo IV y V y algunas enterotoxinas (sek y seq). SCCmec IV ó V junto con PVL han sido postulados como marcadores moleculares de SARM-CO presentándose de una manera estable entre la mayoría de este tipo de aislamientos, sin embargo en algunos países, el porcentaje de positividad para PVL entre aislamientos de SARM-CO es inferior a 5% (O'Brien, et al. 2004).

A diferencia de SARM-CO, SARM-H asociado a infecciones nosocomiales porta el SCCmec I o II, adicionalmente presenta un perfil de multiresistencia a antibióticos y no posee factores de virulencia adicionales (PVL) (Okuma, et al. 2002). Se han descrito diferentes definiciones para clasificar las infecciones por SARM comunitarias y nosocomiales según la presencia de factores de riesgo y el tiempo en el que fue aislado el microorganismo luego de la hospitalización y se han clasificado como infección adquirida en comunidad (IAC) e infección nosocomial (IN) y en algunos casos en infección asociada al cuidado de la salud (IACS) (Tabla 3).

4.4 INFECCIONES NOSOCOMIALES CAUSADAS POR SARM-CO

Las IN por SARM son generalmente causadas por aislamientos con características fenotípicas y genotípicas correspondientes a cepas SARM-H. Sin embargo, desde la emergencia de las cepas SARM-CO, la transmisión nosocomial de este tipo de aislamientos ha sido documentada en Estados Unidos (Popovich, et al. 2008), algunos países Europeos como Francia (Donnio, et al. 2004) e Italia (Campanile, et al. 2011) y de América Latina como Brasil, Argentina, Uruguay (Benoit, et al. 2008) y Colombia (Buitrago G 2008).

Uno de los primeros reportes fue realizado en dos hospitales de Estados Unidos, en los cuales, se describieron brotes de infección en mujeres en periodo de

puerperio causados por cepas SARM-CO (Saiman, et al. 2003). Igualmente, la proporción de aislamientos de SARM que portaban el SCCmec tipo IV se incrementó de <20% en 1999 a 50% en 2004 en un hospital de Estados Unidos (Maree, et al. 2007) y en ese mismo año en Atlanta se detectó a USA-300, un clon SARM-CO, como agente causal del 20% de las bacteremias por SARM (Seybold, et al. 2006).

En Colombia, un estudio realizado por Álvarez et al., en el cual se incluyeron aislamientos de SARM obtenidos de pacientes reclusos en 5 hospitales de tercer nivel de Bogotá, se reportó que el 39% de las IN fueron causadas por aislamientos con características de SARM-CO (SCCmec tipo IV y PVL +), constituyendo un porcentaje mucho mayor al observado en otros países de América Latina como Uruguay (21%) (Alvarez, et al. 2010).

Tabla 3. Clasificación del origen de las infecciones por SARM

Origen de la Infección	Criterios de clasificación
Infección adquirida en la comunidad	A. Enfermedad clínica por evidente al ingreso B. Aislamiento de SARM en las primeras 72 horas C. Ausencia de factores de riesgo
Infección nosocomial	D. Enfermedad clínica no evidente E. Aislamiento de SARM después de las primeras 72 horas de hospitalización F. Presencia de factores de riesgo: Hospitalización, intervención quirúrgica o tratamiento prolongados con antibióticos en los últimos 6 meses, uso de catéteres, fibrosis quística o diabetes mellitus y conviviente con trabajadores de la salud

Fuente: Tomado de (Cohen, et al. 2007)

5. TIPIFICACIÓN DE SARM

5.1 FUNDAMENTO Y APLICACIONES

La tipificación de microorganismos ha sido una herramienta ampliamente difundida en los últimos años y utiliza una gran variedad de técnicas que comparan independiente de su fundamento dos o más microorganismos, de tal modo que se puede reconocer la relación entre ellos y en algunos casos vincularlos epidemiológicamente o asociarlos con un ancestro común. Inicialmente estos estudios se basaban en comparaciones fenotípicas como propiedades antigénicas, metabólicas o de resistencia antibiótica, sin embargo este tipo de análisis son limitados al tratar de establecer diferencias o similitudes entre microorganismos.

Actualmente existen múltiples métodos desarrollados y aplicados para la tipificación molecular de microorganismos basándose en técnicas de bandeo y secuenciación y pueden diferenciarse en: 1) Análisis de ADN extracromosómico, 2) Restricción de ADN cromosómico y detección de secuencias por hibridación (sondas), 3) Macrorrestricciones de ADN cromosómico, 4) Amplificación de secuencias genéticas con o sin restricción, 5) Análisis de ADN por secuenciación y 6) Perfil de hibridación de múltiples secuencias (Soll, et al. 2003).

5.2 TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN

La técnica de tipificación a aplicar depende de la situación epidemiológica específica a estudiar, la rapidez necesaria en la emisión del resultado y la capacidad tecnológica de cada laboratorio. Entre las técnicas de tipificación utilizadas para el análisis epidemiológico de *S. aureus* y que en la actualidad son ampliamente usadas se encuentran la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), la tipificación del gen *spa* y las MLST.

5.2.1 PFGE

La PFGE se basa en la digestión del ADN cromosómico utilizando la enzima de restricción SmaI, seguida por electroforesis en gel de agarosa en un gradiente de voltaje que es alternado en diferentes direcciones. Los patrones de bandeo obtenidos son analizados usando un paquete de software especializado (GelCompar II, UPGMA) que diferencian y posteriormente agrupan patrones similares, tomando como criterio que los aislamientos que posean el mismo perfil de PFGE son considerados como idénticos, aislamientos que presentan diferencias de una a tres bandas, están probablemente relacionados, aislamientos con diferencias de cuatro a seis bandas están posiblemente relacionados y los que presenten más de seis bandas diferentes se consideran como no relacionados. Estos criterios son aplicables sólo para el análisis de un pequeño número de aislamientos obtenidos durante un estudio epidemiológico de brotes hospitalarios o comunitarios durante un corto periodo de tiempo (1 a tres meses), donde presumiblemente, la variación genética es limitada.

5.2.2 Tipificación del gen spa

El gen spa codifica para la proteína A que forma parte de la pared bacteriana de *S. aureus* y es uno de los factores de virulencia portado en casi el 100% de este género bacteriano. En este gen se reconoce una región altamente polimórfica conocida como región hipervariable X. Los polimorfismos ubicados en esta región han sido ampliamente utilizados en la caracterización de SARM y en el estudio de brotes hospitalarios y a diferencia de otros marcadores presenta un amplio poder de discriminación con alto rendimiento y reproducibilidad.

5.2.3 MLST

La MLST se basa en la amplificación y posterior secuenciación y análisis de secuencia de fragmentos de siete genes codificantes de proteínas constitutivas, implicadas en rutas metabólicas indispensables para la supervivencia de *S. aureus* (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* y *yqiL*). Un alelo distinto es asignado a cada una de las diferentes secuencias de cada gen y el perfil alélico en conjunto es designado como tipo de secuencia (ST). Esta técnica comparte las ventajas de las metodologías basadas en amplificación por PCR y secuenciación, presentando una mayor reproducibilidad y resolución.

Aunque la PFGE ha sido considerada la técnica de referencia para la tipificación de *S. aureus*, su uso ha venido siendo reemplazado por técnicas basadas en secuenciación debido a problemas de reproducibilidad entre laboratorios, protocolos de manejo muy exigentes, realización de número de muestras reducido, uso de equipos especializados y menor poder de discriminación. Por su parte la MLST comparte las ventajas de las metodologías basadas en PCR y posterior secuenciación, presentando un alto poder de discriminación, maneja una nomenclatura estándar internacional que permite la comparación con las diferentes cepas tipificadas a nivel mundial. Actualmente esta metodología es ampliamente usada en estudios evolutivos y es considerada el “gold standard” para la evaluación de evolución molecular de *S. aureus*.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer el o los complejos clonales de los aislamientos de SARM obtenidos de pacientes pediátricos del Hospital Universitario de Santander (HUS).

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar los aislamientos de SARM mediante secuenciación de genes multilocus (MLST) e identificar el tipo de secuencia (ST)
2. Establecer la relación entre los complejos clonales, el tipo de spa y de SCCmec
3. Asociar los tipos de secuencia (ST) obtenidos con las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio descriptivo, en el que se incluyeron aislamientos de SARM obtenidos de pacientes pediátricos que fueron internados en el Servicio de Infectopediatría del Hospital Universitario de Santander, que presentaron infecciones locales o sistémicas por SARM durante el periodo de tiempo comprendido entre enero de 2007 a enero de 2008 y que cumplieron con los siguientes criterios: 1. Aislamiento de *S. aureus* con resistencia a oxacilina en cualquier secreción corporal y 2. Consentimiento informado por parte de padres o cuidadores responsables.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE SARM

La identificación inicial de SARM se determinó en el Laboratorio Clínico del Hospital Universitario de Santander, utilizando el sistema automatizado para microbiología BD Phoenix™ 100.

Todos los SARM recolectados fueron cultivados en agar BHI (*brain-heart infusion*) y conservados por criopreservación a -70°C con glicerol al 20%.

7.3 EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO

El ADN cromosómico fue aislado de un cultivo masivo de *S. aureus* crecido durante toda la noche en 15 ml de BHI. El cultivo se centrifugó a 4.000 rpm, el precipitado bacteriano fue resuspendido en 3 ml de 0.5 mM EDTA pH 8 y para el debilitamiento de la pared bacteriana se adicionaron las enzimas lisozima y lisostafina a concentraciones de 20 mg/ml y 2 mg/ml respectivamente, incubándose a 37°C por 1 hora. Para completar la lisis bacteriana se adicionó

proteínasa K (20 mg/ml) y se incubó a 56°C por 30 minutos. La precipitación de proteínas se realizó con 5 M acetato de sodio y centrifugación a 14.000 rpm. El ADN fue recuperado por precipitación con isopropanol y centrifugación a 14.000 rpm. Finalmente el ADN fue resuspendido en 100 µl de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8). La concentración y pureza del ADN se determinó por espectrofotometría (260/280nm).

7.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE SARM

La confirmación de los aislamientos de SARM fue realizada mediante la detección de dos genes, el gen *nuc*, específico de especie y el gen *mecA*, determinante de resistencia a meticilina.

El gen *nuc* codifica para una nucleasa termoestable (thermonuclease, TNase, DNase), con función de endonucleasa que degrada ácidos nucleicos (ADN y ARN). La detección de este gen se realizó mediante amplificación por PCR utilizando los iniciadores *nucA-F* y *nucA-R* que generan un amplificado de 299 pb (Tabla 4). De la misma manera se realizó la detección del gen *mecA*, determinante de resistencia que codifica para la PBP2a, enzima con baja afinidad a los betalactámicos producida por todas las cepas de SARM. Para la detección del gen *mecA* se utilizaron los iniciadores *mA2* e *IS2* que limitan una región de 533 pb (Tabla 4).

Se realizaron amplificaciones independientes en un volumen final de 20 µl que contenían buffer de reacción a una concentración final de 1X, 2.5mM de MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfatado, 0.5 µM de cada iniciador (*nuc*, *nucA-F* y *nucA-R* y *mecA*, *mA2* y *IS2*), 1 unidad de Taq DNA polimerasa y 1 µl de ADN bacteriano. La amplificación se realizó en un termociclador Biorad con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, anillamiento a 55°C por 1

minuto y extensión a 72°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 2 minutos. En las dos reacciones de amplificación se utilizó como control positivo se la cepa NRS100 (Cepa COL).

Tabla 4. Secuencia de iniciadores que amplifican los genes nuc y meca

Iniciador	Secuencia	Tamaño del Amplificado	Referencia
nuc-F	5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	279 pb	(Brakstad, et al. 1992)
nuc-R	5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'		
mA-2	5'-AAC GTT GTA ACC CCA AGA-3'	533 pb	(Okuma, et al. 2002)
IS-2	5'-TGA GGT TAT TCA GAT ATT TCG ATC TC-3'		

7.5 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS DE SARM

7.5.1 MLST

La MLST se basa en el análisis por secuenciación del ADN de fragmentos (450-500 pb) de siete genes codificantes de proteínas constitutivas (“housekeeping genes”) implicadas en rutas metabólicas indispensables para la supervivencia de *S. aureus* (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* and *yqiL*). En la MLST se realizan cuatro fases luego de la extracción del ADN bacteriano: 1) Amplificación de los fragmentos génicos, 2) Purificación de los amplificados, 3) Secuenciación de ADN y 4) Análisis de secuencia.

Las cepas control utilizadas en la técnica de MLST fueron las siguientes:

(Cedidas por NARSA, Network on Antimicrobial Resistance in *S. aureus*.)

- NRS100 (Cepa COL, ST250, SCCmec-I, t008)
- NRS70 (Cepa N315, ST5, SCCmec-II, t002)
- NRS123 (Cepa MW2, ST1, SCCmec-IV, t128)
- NRS71 (Cepa E-MRSA-16, ST36, SCCmec-II, t018)
- NRS106 (Cepa RN4220/pG01, ST8, *mecA* negativo)

A. Amplificación de los fragmentos génicos

Los fragmentos de ADN fueron amplificados por PCR. La reacción de amplificación fue desarrollada en un termociclador DNAEngine^R marca Bio-Rad. Cada reacción de PCR contenía 10 ng de ADN, 8,7 pmol de iniciadores para cada uno de los genes (Tabla 5), 250 µM de cada desoxinucleótido trifosfatado (dNTPs), buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM y 2 unidades de Taq DNA polimerasa, llevándose a un volumen final de 50 µl con agua.

Las condiciones de amplificación fueron: 4 minutos de desnaturalización inicial, 30 ciclos de amplificación (1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C) y se finalizó con una fase de extensión a 72°C por 4 minutos.

Tabla 5. Iniciadores para la amplificación de los fragmentos génicos en la MLST.

Gen	Producto génico	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado
<i>arcC</i>	Carbamato quinasa	<i>arcC</i> -F	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	456pb
		<i>arcC</i> -R	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE</i>	Shikimato deshidrogenasa	<i>aroE</i> -F	ATCGGAAATCCTATTTTACATTC	456 pb
		<i>aroE</i> -R	GGTGTGTATTAATAACGATATC	
<i>glpF</i>	Glicerol quinasa	<i>glpF</i> -F	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465 pb
		<i>glpF</i> -R	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
<i>Gmk</i>	Guanilato quinasa	<i>gmk</i> -F	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429 pb
		<i>gmk</i> -R	TCATTAACACTACAACGTAATCGTA	
<i>Pta</i>	Fosfato acetiltransferasa	<i>pta</i> -F	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474 pb
		<i>pta</i> -R	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	

Gen	Producto génico	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado
<i>Tpi</i>	Triosafofato	<i>tpi</i> -F	TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA	402 pb
	isomerasa	<i>tpi</i> -R	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
<i>yqiL</i>	Acetil coenzima A	<i>yqiL</i> -F	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC	516 pb
	acetiltransferasa	<i>yqiL</i> -R	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

B. Purificación de los amplificados

Los productos de PCR fueron purificados mediante el sistema de QIAquick (Qiagen, Izasa), según las instrucciones del fabricante.

C. Secuenciación de ADN

La reacción de secuenciación de los productos de PCR fue llevada a cabo en el centro de servicios de MacroGen Inc. en Seúl, Korea. Para cada gen se realizaron dos reacciones de secuenciación una para cada hebra de ADN, en una de estas reacciones se utilizó el iniciador 3'-5' y en la otra el complementario 5'-3', utilizando placas de microtitulación, en un volumen de 20 µl. Se utilizaron los mismos iniciadores utilizados en la amplificación. La reacción de secuenciación fue desarrollada en el DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD) usando el ABI BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante. La purificación de la reacción de secuenciación para remover terminadores no incorporados y dNTPs fue realizada según recomendaciones de Applied Biosystems. Finalmente las muestras fueron inyectadas para ser secuenciadas en un ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

D. Análisis de secuencia

Las secuencias obtenidas para cada gen fueron alineadas con los alelos publicados en la base de datos MLST (<http://www.mlst.net/databases/default.asp>) utilizando el software Clustal W con el fin de identificar los cambios de nucleótidos, inserciones y deleciones que se pudieron producir en las cepas analizadas, delimitar el fragmento génico exacto a analizar y poder editar la secuencia. Una vez editadas, las secuencias se compararon con los alelos almacenados en la base de datos MLST y para cada gen se obtuvo un alelo y el perfil alélico correspondió al tipo de secuencia (ST) para cada cepa.

Los ST obtenidos fueron analizados con el software eBURST V3 para determinar el genotipo ancestral y los genotipos que descienden del mismo. eBURST V3 utiliza un modelo sencillo para predecir la evolución bacteriana en el cual el genotipo ancestral es el más frecuente en la población y se diversifica para producir un conjunto de genotipos estrechamente relacionados que son descendientes del genotipo ancestral, este grupo hace referencia a un complejo clonal (CC) determinado.

7.5.2 Tipificación de SCCMEC

El tipo de SCCmec se determinó según las combinaciones del complejo *mec* y el complejo *ccr* mediante reacciones de PCR independientes, utilizando los iniciadores y las condiciones reportadas previamente (Chongtrakool, et al. 2006; Oliveira and de Lencastre 2002)

7.5.3 Tipificación del Gen SPA

La tipificación de la región polimórfica X del gen *spa* se realizó mediante amplificación por PCR utilizando los iniciadores *spa-1113f* 5'-

TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3' y spa-1514r 5'-
CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3' que amplifican un fragmento entre 300 y 500
pb, que varía en tamaño en relación con el número de repeticiones. Los
amplicones fueron secuenciados usando los mismos iniciadores utilizados en la
PCR (Shopsin, et al. 1999).

El tipo de *spa* fue identificado mediante comparación bioinformática utilizando la
base de datos SeqNet.org, un servidor centralizado que contiene
aproximadamente 3900 tipos de *spa* de 60.000 aislados de *S. aureus* provenientes
de 52 países, utilizando el software Ridom StaphType (Harmsen, et al. 2003).

8. RESULTADOS

8.1 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MLST

El análisis de tipificación mediante MLST permitió la asignación de ST en 51 de los 53 SARM evaluados en este estudio. En la Tabla 6 se muestran los alelos correspondientes a cada uno de los genes estudiados y el perfil alélico y ST al que corresponden. Los dos aislamientos restantes presentaron electroferogramas con ambigüedades que impidieron hacer el análisis de secuencia.

Tabla 6. Perfil alélico de las cepas de SARM

Perfil alélico							ST	Nº de aislamientos (%)
arcC	aroE	glpF	gmk	pta	tpi	yqiL		
3	3	1	1	4	4	3	8	34 (64.7)
1	4	1	4	12	1	10	5	9 (19.6)
1	3	1	14	11	51	10	80	1 (1.9)
22	1	14	23	12	4	31	88	2 (3.9)
3	1	1	8	1	1	1	188	1 (1.9)
3	32	1	1	4	4	3	254	2 (3.9)
3	106	1	1	4	4	3	552	1 (1.9)
3	3	1	88	4	4	3	931	1 (1.9)
Total aislamientos con ST asignado								51

Todos los perfiles alélicos obtenidos y sus alelos correspondientes se encontraban consignados en la página www.mlst.net.

Se identificaron 8 STs diferentes entre los aislados, el ST 8 fue el más frecuente (34/51) seguido por el ST 5 (9/51). Los STs que compartían el 100% de identidad genética en 5 de los 7 alelos fueron agrupados en un mismo complejo clonal y el

genotipo ancestral probable fue establecido utilizando el software eBURST V3 distribuyéndose en un grupo y 4 “singletons” (ST5, ST 88, ST 188 y ST 80). El grupo generado fue constituido por el ST 8 como genotipo fundador (ancestral), el ST 254, ST 552 y ST 931 como variantes en un solo locus (SLV, *Single Locus Variant*) con respecto al ST8 (Figura 12 (A)).

Para identificar si se presentaba una gran de diferencia entre los STs a escala de nucleótidos, una red mínima de expansión fue generada (Figura 12 (B)). Esta metodología no toma en consideración eventos de recombinación, analiza todas las mutaciones o variaciones de nucleótidos presentes entre las muestras.

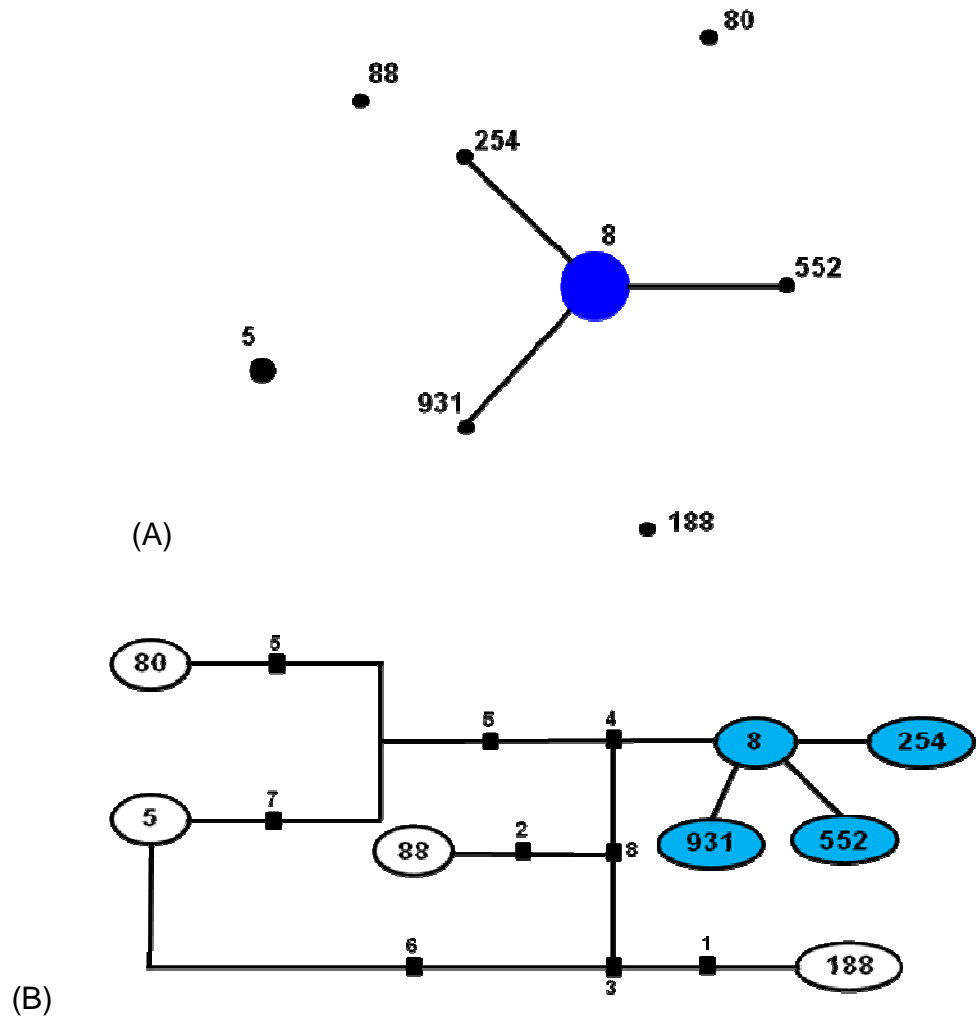
8.2 TIPIFICACIÓN DE SCCMEC

En la Tabla 7 se resumen los resultados de la tipificación SCCmec. El tipo de SCCmec más frecuente fue SCCmec IV con 79% (42 aislamientos), seguido por SCCmec I 15 % (8 aislamientos) y 3 aislamientos no fueron tipificables.

Tabla 7. Tipos de SCCmec identificados entre los aislamientos de SARM

Nº de aislamientos n (%)	Tipo de SCCmec	Complejo <i>ccr</i>		Complejo <i>mec</i>	
		1	2	A	B
8 (15,1)	I	+	-	-	+
42 (79,2)	IV	-	+	-	+
3 (5,7)	NT	-	-	-	-

Figura 12. Distribución de los STs detectados.



(A) Análisis por eBURTS V3 de los datos de MLST de los aislamientos analizados en este estudio. El número representa el ST. Los STs unidos por líneas pertenecen al mismo complejo clonal. El tamaño de los círculos es directamente proporcional al número de aislamientos que presentan el ST representado. (B) Red mínima de expansión de los datos de MLST de los mismos aislados analizados en (A). Los círculos representan los STs con el número en su interior. Los puntos representan cambios de nucleótidos entre los STs adyacentes.

8.2.1 Asociación entre STs y el tipo de SCCmec

Con la caracterización en cada aislamiento del tipo de SCCmec y ST se logró la identificación de diferentes clones de SARM. En la Tabla 8 se observa la distribución de SCCmec-IV y SCCmec-I entre los 8 genotipos identificados.

Entre los aislamientos correspondientes al genotipo ST8 se observó que el 91,1% de los SARM portaban SCCmec-IV (31/34) y 5,8% SCCmec-I (2/34), identificándose el clon ST8-SARM-IV conocido como USA 300 y el clon ST8-SARM-I. Entre los aislamientos de ST 5 el mismo porcentaje (44,4%) portaron SCCmec-IV y SCCmec-I, correspondiendo a los clones ST 5-SARM-IV y ST5-SARM-I o clones Pediátrico y Córdoba/Chileno, respectivamente.

Otros clones menores fueron identificados en los aislamientos de SARM entre los cuales están el clon ST80-SARM-IV, ST88-MRSA-IV, ST188-SARM-IV, ST254-MRSASARMIV, ST254-SARM-I, ST552-SARM-IV y ST931-SARM-I.

Tabla 8. Distribución de los tipos de SCCmec entre los STs identificados

ST	Tipo de SCCmec ¹		
	IV	I	NT
5	4 (10)	4 (50)	1 (33,3)
8	31 (77,5)	2 (25)	1 (33,3)
80	1 (2,5)	-	-
88	1 (2,5)	-	1 (33,3)
188	1 (2,5)	-	-
254	1 (2,5)	1 (12,5)	-
552	1 (2,5)	-	-
931	-	1 (12,5)	-

¹En cada columna se presenta el número absoluto de aislamientos y entre paréntesis el porcentaje correspondiente.

8.3 TIPIFICACIÓN DEL GEN SPA

Mediante la tipificación del gen *spa* fueron identificados 10 tipos de *spa* (Tabla 9) entre los cuales se distribuyeron los aislamientos de SARM. Se identificaron dos secuencias de repeticiones que no han sido reportadas (NR) en la base de datos Spa Server correspondiendo a dos nuevos posibles tipos de *spa*. De los 53 aislamientos uno no se pudo tipificar por esta metodología ya que no se identificaron las regiones conservadas en 5' y 3' indispensables para la delimitación de la región a analizar.

Tabla 9. Tipos de *spa* identificados en los aislamientos de SARM

Tipo de <i>spa</i>		Repeticiones	n (%)
Nomenclatura Ridom	Nomenclatura Kreiswirth		
t008	YHGFMBQBLO	r11r19r12r21r17r34r24r34r22r25	4 (7,5)
t024	YGFMBQBLO	r11r12r21r17r34r24r34r22r25	30 (56,6)
t044	UJGBBPB	r07r23r12r34r34r33r34	1 (1,9)
t149	TO2MEMDMGMGMK	r26r30r17r13r17r20r17r12	8 (15,1)
t189	UJGFMB	r07r23r12r21r17r34	1 (1,9)
t1635	YHGFMBBO	r11r19r12r21r17r34r25	1 (1,9)
t1705	YBQBLO	r11r34r24r34r22r25	1 (1,9)
t1814	UGFMBBBPB	r07r12r21r17r34r34r34r33r34	2 (3,8)
t2953	YGFMBQBLOO	r11r12r21r17r34r24r34r22r25r25	1 (1,9)
t4088	TO2MDMGMGMK	r26r30r17r20r17r12r17r12r17r16	1 (1,9)
NR-1 ¹	-	r11r19r12r12r34r22r24r34r22r25	1 (1,9)
NR-2 ¹	-	r11r12r156r17r34r24r34r22r25	1 (1,9)

¹NR, No reportado. La secuencia de repeticiones identificada no ha sido reportada en la base de datos de Spa Server.

8.3.1 Asociación entre ST y tipo de *spa*

Los tipos de *spa* identificados se encontraron distribuidos entre los 10 ST asignados. La mayoría de los aislamientos con genotipo ST 8 fueron tipificados como *spa* t024 (24/34), seguido por t008 (4/34) y se identificaron dentro de este

genotipo en menor proporción cinco tipos de *spa* adicionales, t1635, t1705, t2953 y dos tipos de *spa* no reportados (NR-1 y NR-2). Dentro del grupo de los ST 5 se asignaron dos tipos de *spa* t149 (8/9) y el t4088 (1/9). Otros tipos de *spa* fueron identificados con menor frecuencia el t044, t189 y t1814 (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución de los tipos de *spa* entre los STs identificados

ST	Tipo de <i>spa</i> ¹											
	t008	t024	t044	t149	t189	t1635	t1705	t1814	t2953	t4088	NR-1	NR-2
5	-	-	-	8 (88,9)	-	-	-	-	-	1 (11,1)	-	-
8	4 (12,1)	24 (72,7)	-	-	-	1 (3)	1 (3)	-	1 (3)	-	1 (3)	1 (3)
80	-	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	2 (100)	-	-	-	-
188	-	-	-	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-	-
254	-	2 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
552	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
931	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹En cada columna se presenta el número absoluto de aislamientos y entre paréntesis el porcentaje correspondiente

8.4 CLONES DE SARM Y LAS INFECCIONES EN EL SERVICIO DE INFECTOPEDIATRÍA DEL HUS

El origen de la infección por SARM fue definido según la presencia o no de factores de riesgo clasificándose en infección adquirida en comunidad (IAC) e infección nosocomial (IN).

Figura 13. Relación entre los clones de SARM y el origen de infección

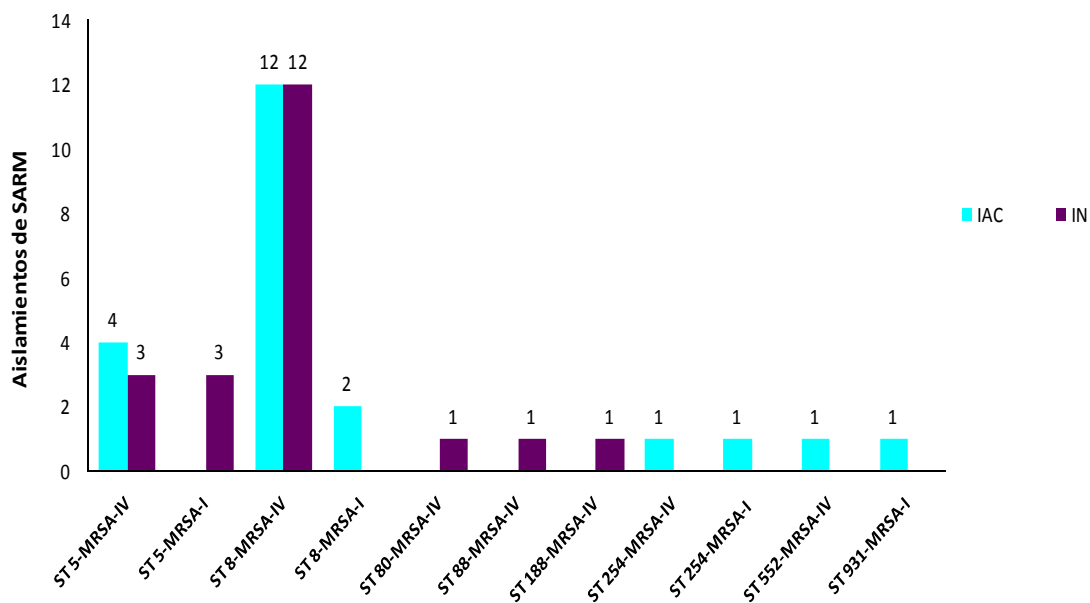


Tabla 11. Relación entre los clones de SARM y el origen de infección

Clon	Infección adquirida en comunidad ¹	Infección nosocomial ¹
ST 5-SARM-IV	4 (50)	3 (37,5)
ST 5- SARM -I	-	3 (75)
ST 8- SARM -IV	12 (38,7)	12 (38,7)
ST 8- SARM -I	2 (100)	-
ST 80- SARM -IV	-	1 (100)
ST 88- SARM -IV	-	1 (100)
ST 188- SARM -IV	-	1 (100)
ST 254- SARM -IV	1 (100)	-
ST 254- SARM -I	1 (100)	-
ST 552- SARM -IV	1 (100)	-
ST 931- SARM -I	1 (100)	-

¹ En cada columna se presenta el número absoluto de aislamientos y entre paréntesis el porcentaje correspondiente

Tabla 12. Infecciones causadas por clones de SARM

Clon	Infecciones de piel		Infección osteoarticular	Otras infecciones ³
	Primarias ¹	Secundarias ²		
ST 5- SARM -IV	1	2	-	1
ST 5- SARM -I	2	-	-	-
ST 8- SARM -IV	12	8	4	3
ST 8- SARM -I	2	-	-	-
ST 80- SARM -IV	-	1	-	-
ST 88- SARM -IV	-	1	-	-
ST 188- SARM -IV	-	1	-	-
ST 254- SARM -IV	1	-	-	-
ST 254- SARM -I	-	1	-	-
ST 552- SARM -IV	1	-	-	-
ST 931- SARM -I	-	-	1	-

¹ Incluye abscesos, celulitis, forunculosis, piodermitis, onfalitis, impétigo y piomocitis.

² Incluye infección en quemaduras de 1^o y 2^o grado, mordedura, celulitis secundaria a escabiosis e infección en herida quirúrgica.

El 43,4% de los SARM analizados en este estudio estuvieron relacionados con IN (23/53) y el 37,7% con IAC. Por la falta de datos clínicos y epidemiológicos 10 infecciones no pudieron ser clasificadas (18,9%). En la Figura 14 se relacionan los clones de SARM identificados con el tipo de infección (IAC o IN). Los clones ST 8-SARM-IV y ST 5-SARM-IV así como los clones menores causaron tanto IAC como IN (Figura 14 y Tabla 11).

Las principales manifestaciones clínicas estuvieron asociadas a infecciones de piel de primero y segundo grado (42,2% y 33,3% respectivamente), infección osteoarticular (11,9%) y en menor proporción otros tipos de infección (9,5%) como bacteriemia, neumonía, peritonitis y shock séptico. Las infecciones de piel (de primero y segundo grado) y osteoarticulares fueron causadas en su mayoría por el clon ST 8-SARM-IV constituyendo el 60,6% y el 80% respectivamente (Tabla 12).

9. DISCUSIÓN

S. aureus y en general los microorganismos de tipo bacteriano poseen una conocida habilidad para generar cambios genéticos rápidos y estabilizarlos en su genoma. Esta característica hace indispensable realizar la tipificación fenotípica y genotípica de los aislamientos obtenidos para realizar una vigilancia epidemiológica que permita entender el comportamiento y distribución de los microorganismos patógenos y de esta manera establecer medidas apropiadas de control de la infección y su diseminación.

La caracterización molecular de los aislamientos de SARM adelantada en este trabajo constituye el primer estudio de tipificación molecular de este tipo de aislamientos realizado en nuestra región, y el primer estudio que combina tres técnicas diferentes para realizar una caracterización más completa en un alto número de aislamientos de SARM en el país.

Entre los aislamientos se identificaron 8 perfiles alélicos o STs, dos de los cuales ya habían sido detectados anteriormente en Colombia, el ST5 y ST8 (Alvarez-Olmos, et al. 2009; Arias, et al. 2008; Mendes, et al. 2010; Olarte, et al. 2010; Reyes, et al. 2009). Cabe señalar, que estos dos ST fueron caracterizados en estudios previos basados principalmente en PFGE, donde se seleccionó un número limitado de cepas representativas de los pulsotipos para ser caracterizados por MLST; obtenidos ya sea de un grupo de mayor número de aislamientos o en estudios donde se evaluaron aislamientos individuales.

ST8 fue el perfil alélico encontrado con mayor frecuencia en nuestro estudio y teniendo en cuenta que los aislamientos pertenecientes a este genotipo portaron en su mayoría SCCmec tipo IV, podría definirse como un complejo clonal dominante (ST8-SARM-IV); el cual se relaciona genéticamente con el clon USA-300 que presenta un ST y tipo de SCCmec idéntico (Moran, et al. 2006).

Inicialmente el clon USA-300 fue identificado en Estados Unidos causando IAC, sin embargo algunos casos de IN también han sido reportados. Aunque este clon rápidamente se diseminó por Norte América (Moran, et al. 2006) en los países europeos como Alemania, luego de la detección inicial, su aislamiento ha sido infrecuente (Monecke, et al. 2008), al igual que en Reino Unido (Otter, et al. 2009), Suiza (Monecke, et al. 2007) y Australia, sin embargo en este último país el número de aislamientos tiende a aumentar (Monecke, et al. 2009). Por su parte en América Latina, ha sido detectado en Brasil (Ribeiro, et al. 2007) y en Costa Rica (Goering, et al. 2008), correspondiendo a un pequeño número de los aislamientos de SARM en esos países.

Arias et al. reportaron a USA-300 como un clon predominante en Colombia al caracterizar 12 aislamientos obtenidos en 4 ciudades del país que pertenecientes al mismo pulsotipo y ST de dicho clon (Arias, et al. 2008), lo cual concuerda con lo observado en este trabajo donde la mayoría de los aislamientos corresponden a clones genéticamente relacionados con USA-300. El hecho de encontrar un alto porcentaje de este tipo de aislamientos ratifica la diseminación y predominancia del clon en el país y constituye un dato importante de la epidemiología molecular de los aislamientos circulantes en Bucaramanga, específicamente los obtenidos en el HUS.

Al igual que lo descrito previamente para USA-300, la mayoría de las infecciones causadas por el clon ST8-SARM-IV fueron infecciones de piel y tejidos blandos y en algunos casos presentó compromiso osteoarticular (2 casos) y bacteriemia (2 casos). Adicionalmente, USA-300 ha sido caracterizado por presentar infecciones de rápida progresión hacia enfermedades más severas como fascitis necrotizante, bacteriemia y artritis (Bocchini, et al. 2006; Mongkolrattanothai, et al. 2003). Esta capacidad es relacionada con la presencia de varios factores de virulencia, dentro de los cuales el papel de PVL ha sido ampliamente estudiado, como una toxina que genera incremento de la respuesta inflamatoria y daño tisular directo, sin

embargo en algunos estudio su papel en la patogénesis de la infección por SARM ha sido cuestionado (Bubeck Wardenburg, et al. 2008; Voyich, et al. 2006).

Un estudio realizado por nuestro grupo evaluó la frecuencia de los genes de PVL en aislamientos de SARM, incluyendo a los caracterizados en este trabajo y se observó una frecuencia génica del 91%. Las IOA y bacteriemias causadas por los clones ST8-SARM-IV podrían relacionarse con la presencia de la PVL en estos aislamientos, sin embargo se debe tener en cuenta que los aislamientos analizados aquí fueron obtenidos en un centro hospitalario de alta complejidad donde son remitidos pacientes en estado crítico o avanzado de infección, con lo cual la severidad podría deberse al tiempo de evolución de la enfermedad y no a la presencia de factores de virulencia de la cepa aislada.

Otros clones identificados en este estudio fueron genéticamente similares a los clones Pediátrico y Cordobés/Chileno los cuales tienen el mismo perfil genético ST5, pero difieren en el tipo de SCCmec portado, siendo SCCmec tipo IV y SCCmec tipo I respectivamente.

En la actualidad, el clon Pediátrico (ST5- SARM-IV) se ha establecido en varios países europeos y de América Latina (Gomes, et al. 2001) (Corso, et al. 1998). Inicialmente fue reportado en Portugal en un hospital pediátrico y allí este clon se caracterizó por ser sensible a la mayoría de los antibióticos, mostrando resistencia solo frente a betalactámicos y alta frecuencia en infecciones pediátricas.

En Colombia, Gómez et al evaluaron 76 SARM, observando que adicional a la resistencia frente a antibióticos de tipo betalactámico (penicilina y oxacilina), los aislamientos presentaban resistencia a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina, cloranfenicol y trimetropin sulfametoxazol y se reportó el clon Pediátrico como un clon multirresistente. En concordancia con lo expuesto por Gómez, los clones identificados como ST-5-SARM-IV en este

estudio, fueron resistentes a los antibióticos nombrados anteriormente a excepción de tetraciclina y el trimetropin sulfametoxazol, confirmando la multirresistencia que a diferencia de lo reportado en otros lugares presenta este clon en el país.

Por otra parte, el clon Cordobés/Chileno (ST5- SARM-I) fue detectado por primera vez en Chile en 1997 y Argentina en 1999, convirtiéndose en el clon predominante en estos países. La mayoría de los aislamientos de este clon presentan un perfil de resistencia a múltiples fármacos y han sido vinculados a brotes de infecciones hospitalarias en Córdoba y Buenos Aires (Gardella, et al. 2005; Jeric, et al. 2006; Sola, et al. 2006; Sola, et al. 2002; Sola, et al. 2008). Luego de su detección, rápidamente se diseminó hacia Colombia (Cruz, et al. 2005) y Paraguay (Mayor, et al. 2007). Su detección en nuestro país fue inesperada ya que en Sur América el clon diseminado predominantemente es el Brasileño y adicionalmente Chile y Colombia no comparten límites geográficos, por lo cual la emergencia de un clon inicialmente detectado en un lugar distante como Chile no había sido contemplada.

Al igual que lo reportado previamente en Colombia (Buitrago G 2008; Espinal P 2008), los aislamientos del clon ST5-SARM-I presentaron resistencia a múltiples fármacos (ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina y trimetropin sulfametoxazol) y todos estuvieron relacionados con IN. El predominio del clon Cordobés/Chileno en hospitales podría ser explicado por la selección antibiótica a la cual están sometidas las cepas circulantes en los centros hospitalarios, llevando al incremento de cepas cada vez más resistentes a un mayor número de antibióticos.

Como se ha discutido, la asignación del tipo de SCCmec en combinación con los resultados de MLST complementa la caracterización de las diferentes cepas, facilitando la comparación con cepas analizadas en otros estudios. Se ha descrito que el tamaño del SCCmec está relacionado con su facilidad para transferirse (Ito,

et al. 2001). De acuerdo con esta hipótesis, el SCCmec más pequeño se encontraría asociado a un mayor número de STs. Así de los dos tipos de SCCmec detectados entre los aislamientos el de menor tamaño corresponde al SCCmec tipo IV (22kb) y se encontró asociado con 7 STs y el SCCmec tipo I (40kb) con 4 STs. Los otros tres tipos de SCCmec buscados en este estudio (SCCmec-II, SCCmec-III y SCCmec-V) no fueron detectados, con lo cual los aislamientos que no pudieron ser clasificados en base al SCCmec podrían ser portadores de alguno de los otros tipos (SCCmec VI-VIII) recientemente identificados que no fueron buscados en este estudio.

El SCCmec tipo IV fue encontrado en la mayoría de los aislamientos analizados, siendo portado por todos los genotipos identificados a excepción de ST931. En Colombia, varios estudios de tipificación de SCCmec han sido realizados, incluyendo tanto aislamientos obtenidos de IN como de IAC, detectándose con mayor frecuencia los SCCmec tipo IV y SCCmec tipo I (Mendes, et al. 2010; Olarte, et al. 2010; Reyes, et al. 2009). Al igual que en nuestro estudio, el tipo IV es uno de los elementos más frecuentemente observados en cepas SARM adquiridas en hospitales en otros países, aunque inicialmente el SCCmec tipo IV fue descrito junto con la detección de PVL como un marcador molecular para la clasificación de aislamientos de SARM-CO (Ito, et al. 2004), la identificación de cepas SARM portadoras del SCCmec tipo IV causando infecciones en hospitales ha sido masiva (Benoit, et al. 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo y en anteriores realizados en nuestro grupo, donde fueron detectadas cepas portadoras del SCCmec tipo IV y PVL positivas causando en gran proporción IN, ratifica que la tipificación de estos marcadores no es suficiente para la clasificación de las cepas aisladas como SARM-CO o SARM-H. Además, debido a la diseminación que han tenido estos aislamientos en distintos escenarios, es indispensable la evaluación de características epidemiológicas para definir el origen de la infección.

Con el fin de complementar la caracterización molecular de los clones identificados en este estudio se incluyó la tipificación de la región X del gen spa identificándose entre los SARM doce tipos diferentes. En Colombia son pocos los aislamientos que han sido tipificados por esta metodología, sin embargo han sido asignados tres tipos de spa: spa TIMEMDMGMGMK en un aislamiento con genotipo ST8-SARM-I correspondiente al clon Cordobés/Chileno y t008 y t024, en aislamientos ST-SARM-IV ó USA-300 (Mendes, et al. 2010). Este reporte fue realizado a partir de 7 aislamientos caracterizados por PFGE que pertenecían a los pulsotipos LAT-C y LAT-G (pulsotipos correspondientes a los clones Cordobés/Chileno y USA-300 respectivamente).

El spa t024 fue encontrado con mayor frecuencia en los aislamientos de SARM y estuvo restringido al único grupo clonal identificado (genotipo fundador predicho: ST8), lo que ratifica la estrecha correlación que hay entre el tipo de spa y el ST. Adicionalmente, el genotipo ST8 pudo ser discriminado en 5 tipos de spa: t024, t008, t1635, t1705 y t2953. Lo anterior ha sido descrito en otros estudios donde se ha comparado el poder de discriminación entre la tipificación del gen spa y MLST, observándose que varios tipos de spa corresponden a un solo ST, pero en su mayoría se distribuyen dentro de un mismo complejo clonal (Cookson, et al. 2007; Enright, et al. 2002; Hallin, et al. 2007; Strommenger, et al. 2008).

Entre los tipos de spa identificados en este estudio se encontraron dos secuencias de repeticiones que no habían sido reportadas en las bases de datos de spa (SpaServer.com), NR-1 y NR-2. La identificación de estos dos nuevos tipos de spa podría en parte explicarse por la variabilidad genética de este locus debida a su alta tasa de mutación (Shopsin, et al. 1999); que conlleva a variaciones entre cepas relacionadas, como las pertenecientes a un mismo clon; en este caso dos cepas con el mismo genotipo ST8- SARM-IV. Sin embargo, con el fin de validar los resultados y asignar un consecutivo en las bases de datos de spa (SpaServer.com) es necesaria la confirmación de estos resultados y de esta

manera poder asegurar que los dos tipos de spa NR correspondan a nuevos tipos de spa originados en nuestra región y poder realizar el reporte correspondiente.

Las infecciones causadas por los clones de SARM identificados en este trabajo, fueron clasificadas en tres tipos: infecciones de piel de primero y segundo grado, IOA y otros tipos de infección. Esta clasificación fue realizada en base a reportes previos realizados por nuestro grupo donde se observó que las infecciones causadas por SARM en pacientes pediátricos aislados en el HUS son en su mayoría infecciones de piel de primero y segundo grado (40%) como celulitis y abscesos subcutáneos e IOA (Sosa, et al. 2010) (56%). De acuerdo a lo descrito, los clones de SARM causaron con mayor frecuencia infecciones de piel de primero y segundo grado (42,2% y 33,3% respectivamente), sin embargo en este estudio las IOA fueron observadas en menor proporción (11,9%) a lo descrito por Sosa et al. Aunque otro tipo de infecciones de mayor severidad se presentaron con menor frecuencia (9,5%), es importante resaltar la capacidad de invasión potencial que tiene el SARM para llegar a tejidos más profundos e inclusive causar infecciones sistémicas en pacientes pediátricos. Por otra parte no se encontraron diferencias entre IAC e IN y los clones identificados ya que se encontraron igualmente asociados con los dos orígenes de infección.

CONCLUSIONES

Se identificaron 8 ST entre los aislamientos de SARM, 4 de los cuales fueron agrupados en un complejo clonal cuyo genotipo fundador predicho fue el ST8 del cual se diversificaron 3 SLV.

Mediante la caracterización molecular de los aislamientos de SARM se identificaron 11 clones, de los cuales el ST8-SARM-IV, clon genéticamente relacionado con la USA-300 fue el predominante entre la población.

Se confirmó la presencia de clones de SARM previamente reportados en el país como el clon Pediátrico (ST5- SARM-IV), Cordobés/Chileno (ST5- SARM-I) y USA-300 (ST8- SARM-IV), así como la detección de 8 clones que no habían sido identificados entre los cuales estuvieron el clon Europeo ST80 y el clon epidémico UK-EMRSA-10.

La tipificación del gen *spa* permitió una mayor discriminación de los aislamientos pertenecientes al genotipo ST8, corroborando la alta tasa de variabilidad que presenta este locus.

Se identificaron dos secuencias de repetición que no han sido reportadas en las bases de datos del SpaServer.com, las cuales podrían corresponder a nuevos tipos de *spa* originarios de los aislamientos del Hospital Universitario de Santander.

Se determinó que los aislamientos de SARM se distribuyeron proporcionalmente entre los orígenes de IAC e IN y causaron principalmente infecciones de piel de primero y segundo grado.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de replicación en la población adulta del HUS y el personal que labora en este con el fin de dilucidar la epidemiología molecular del SARM en esta institución de salud.

Adelantar las técnicas de tipificación realizadas en este estudio en los contactos del paciente, para establecer si hay relación de entre los aislamientos de SARM de los contactos y el caso.

Realizar una tipificación de mayor resolución que permita discriminar los subtipos del SCCmec tipo IV identificado en los aislamientos de SARM.

BIBLIOGRAFÍA

(CDC), C. F. D. C. A. P.

1999 Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Minnesota and North Dakota, 1977-1999. JAMA.

AIRES DE SOUSA, M., et al. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. En: J Clin Microbiol Jan, 2003, vol. 41, no. 1, p. 159-63.

ALEXANDER, E. H., and HUDSON, M. C. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. En: Appl Microbiol Biotechnol Aug, 2001, vol. 56, no. 3-4, p. 361-6.

ALVAREZ-OLMOS, M. I., et al. Pediatric cases from Colombia caused by a Panton-Valentine Leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST8-SCCmecIVc clone. En: Pediatr Infect Dis J Oct, 2009, vol. 28, no. 10, p. 935.

ALVAREZ, C. A., et al. Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia. En: Am J Infect Control May, 2010, vol. 38, no. 4, p. 315-8.

ARAKERE, G., et al. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from two hospitals in Bangalore, South India. En: J Clin Microbiol Jul, 2005, vol. 43, no. 7, p. 3198-202.

ARCHER, G. L., and BOSILEVAC, J. M. Signaling antibiotic resistance in staphylococci. En: Science Mar 9, 2001, vol. 291, no. 5510, p. 1915-6.

ARIAS, C. A., et al. MRSA USA300 clone and VREF--a U.S.-Colombian connection? En: N Engl J Med Nov 13, 2008, vol. 359, no. 20, p. 2177-9.

AYLIFFE, G. A. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: Clin Infect Dis Jan, 1997, vol. 24 Suppl 1, no., p. S74-9.

BABA, T., et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. En: Lancet May 25, 2002, vol. 359, no. 9320, p. 1819-27.

BANNERMAN, T. L.

2003 *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. A: Manual of Clinical Microbiology. . Washington D.C. (EEUU).

BARNA, J. C., and WILLIAMS, D. H. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. En: Annu Rev Microbiol 1984, vol. 38, no., p. 339-57.

BELL, J. M., and TURNIDGE, J. D. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998-1999. En: Antimicrob Agents Chemother Mar, 2002, vol. 46, no. 3, p. 879-81.

BENNER, E. J., and KAYSER, F. H. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: Lancet Oct 5, 1968, vol. 2, no. 7571, p. 741-4.

BENOIT, S. R., et al. Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. En: Emerg Infect Dis Aug, 2008, vol. 14, no. 8, p. 1216-23.

BIERBAUM, G., et al. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. En: Eur J Clin Microbiol Infect Dis Oct, 1999, vol. 18, no. 10, p. 691-6.

BOCCHINI, C. E., et al. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. En: Pediatrics Feb, 2006, vol. 117, no. 2, p. 433-40.

BODEN, M. K., and FLOCK, J. I. Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*. En: Mol Microbiol May, 1994, vol. 12, no. 4, p. 599-606.

BOUCHER, H. W., and COREY, G. R. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: Clin Infect Dis Jun 1, 2008, vol. 46 Suppl 5, no., p. S344-9.

BRAKSTAD, O. G., AASBAKK, K., and MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. En: J Clin Microbiol Jul, 1992, vol. 30, no. 7, p. 1654-60.

BROOKS, G. F., et al.

2010 Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. New York, N.Y.: McGraw-Hill Medical.

BUBECK WARDENBURG, J., et al. Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. En: J Infect Dis Oct 15, 2008, vol. 198, no. 8, p. 1166-70.

BUITRAGO G, C. J., CASTILLO JS, LEAL AL, SANCHEZ R, ALVAREZ CA. *Staphylococcus aureus*. Community-acquired phenotype spread in hospitals in Bogota, Colombia. En: Clin Microbiol Infect 2008, vol. 14 no., p. S411.

CAMPANILE, F., et al. Changing Italian nosocomial-community trends and heteroresistance in *Staphylococcus aureus* from bacteremia and endocarditis. En: Eur J Clin Microbiol Infect Dis Aug 7, 2011, vol., no., p.

CASELLAS, J. Comité Resistencia Antibacterianos API. Results survey number 7. En: Revista Panamericana de Infectología 2006, vol. 8, no., p. 48-51.

CDC, C. F. D. C. A. P. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002. En: MMWR Morb Mortal Wkly Rep Oct 11, 2002, vol. 51, no. 40, p. 902.

COOKSON, B. D., and PHILLIPS, I. Epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: J Antimicrob Chemother Apr, 1988, vol. 21 Suppl C, no., p. 57-65.

COOKSON, B. D., et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. En: J Clin Microbiol Jun, 2007, vol. 45, no. 6, p. 1830-7.

CORSO, A., et al. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. En: Microb Drug Resist Winter, 1998, vol. 4, no. 4, p. 277-88.

CRUZ, C., et al. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Colombian hospitals over 7 years (1996-2003): emergence of a new dominant clone. En: Int J Antimicrob Agents Dec, 2005, vol. 26, no. 6, p. 457-62.

CHABBERT, Y. A., and BAUDENS, J. G. [*Staphylococcus* strains naturally resistant to methicillin and 5-methyl-3-phenyl-4-iso-oxazolyl-penicillin]. En: Ann Inst Pasteur (Paris) Aug, 1962, vol. 103, no., p. 222-30.

CHANG, F. Y., et al. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. En: Medicine (Baltimore) Sep, 2003, vol. 82, no. 5, p. 322-32.

CHEUNG, A. I., et al. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (fbpA) encoding a fibrinogen-binding protein. En: Infect Immun May, 1995, vol. 63, no. 5, p. 1914-20.

CHONGTRAKOOL, P., et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. En: Antimicrob Agents Chemother Mar, 2006, vol. 50, no. 3, p. 1001-12.

DE LENCASTRE, H., et al. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. En: Clin Microbiol Infect Jun, 1997, vol. 3, no. 3, p. 289-296.

DEPLANO, A., et al. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. En: Clin Microbiol Infect May, 2000, vol. 6, no. 5, p. 239-45.

DEURENBERG, R. H., and STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. En: Infect Genet Evol Dec, 2008, vol. 8, no. 6, p. 747-63.

DEURENBERG, R. H., et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: Clin Microbiol Infect Mar, 2007, vol. 13, no. 3, p. 222-35.

DIEP, B. A., et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: Lancet Mar 4, 2006, vol. 367, no. 9512, p. 731-9.

DOMINGUEZ, M. A., et al. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. En: J Clin Microbiol Sep, 1994, vol. 32, no. 9, p. 2081-7.

DONNIO, P. Y., et al. Changes in staphylococcal cassette chromosome type and antibiotic resistance profile in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a French hospital over an 11 year period. En: J Antimicrob Chemother May, 2004, vol. 53, no. 5, p. 808-13.

ENRIGHT, M. C., et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. En: J Clin Microbiol Mar, 2000, vol. 38, no. 3, p. 1008-15.

—. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). En: Proc Natl Acad Sci U S A May 28, 2002, vol. 99, no. 11, p. 7687-92.

ESPINAL P, R. M., GAITAN S, MUNˆOZ A. . First detection of Chilean clone in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Colombian–Caribbean region. En: Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008, vol., no., p. 19-18.

FOURNIER, B., and PHILPOTT, D. J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. En: Clin Microbiol Rev Jul, 2005, vol. 18, no. 3, p. 521-40.

FRIDKIN, S. K., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. En: N Engl J Med Apr 7, 2005, vol. 352, no. 14, p. 1436-44.

GARDELLA, N., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Buenos Aires teaching hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. En: Rev Argent Microbiol Jul-Sep, 2005, vol. 37, no. 3, p. 156-60.

GILLET, Y., et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. En: Lancet Mar 2, 2002, vol. 359, no. 9308, p. 753-9.

GOERING, R. V., et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from global clinical trials. En: J Clin Microbiol Sep, 2008, vol. 46, no. 9, p. 2842-7.

GOMES, A. R., et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. En: Microb Drug Resist Spring, 2001, vol. 7, no. 1, p. 23-32.

GONZALEZ-ZORN, B., and COURVALIN, P. VanA-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. En: Lancet Infect Dis Feb, 2003, vol. 3, no. 2, p. 67-8.

GREGORY, P. D., et al. Studies of the repressor (Blal) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. En: Mol Microbiol Jun, 1997, vol. 24, no. 5, p. 1025-37.

GUZMAN-BLANCO, M., et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. En: Int J Antimicrob Agents Oct, 2009, vol. 34, no. 4, p. 304-8.

HACKER, J., and KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. En: Annu Rev Microbiol 2000, vol. 54, no., p. 641-79.

HALLIN, M., et al. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. En: J Clin Microbiol Jan, 2007, vol. 45, no. 1, p. 127-33.

HANAKI, H., et al. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. En: J Antimicrob Chemother Sep, 1998, vol. 42, no. 3, p. 315-20.

HARMSSEN, D., et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. En: J Clin Microbiol Dec, 2003, vol. 41, no. 12, p. 5442-8.

HEROLD, B. C., et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. En: JAMA Feb 25, 1998, vol. 279, no. 8, p. 593-8.

HIRAMATSU, K., et al. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: Trends Microbiol Oct, 2001, vol. 9, no. 10, p. 486-93.

—. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. En: J Antimicrob Chemother Jul, 1997, vol. 40, no. 1, p. 135-6.

HOCHKEPPEL, H. K., et al. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. En: J Clin Microbiol Mar, 1987, vol. 25, no. 3, p. 526-30.

HOOPER, D. C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. En: Drug Resist Updat Feb, 1999, vol. 2, no. 1, p. 38-55.

—. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. En: Clin Infect Dis Mar 15, 2001, vol. 32 Suppl 1, no., p. S9-S15.

HOU, Z., et al. Inhibition of beta-lactamase-mediated oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by a deoxyribozyme. En: Acta Pharmacol Sin Nov, 2007, vol. 28, no. 11, p. 1775-82.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. En: Cell Apr 3, 1992, vol. 69, no. 1, p. 11-25.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS, I.-S. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. En: Antimicrob Agents Chemother 2009, vol. 53, no. 12, p. 4961-7.

ITO, T., et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant

Staphylococcus aureus. En: Antimicrob Agents Chemother May, 2001, vol. 45, no. 5, p. 1323-36.

ITO, T., KATAYAMA, Y., and HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. En: Antimicrob Agents Chemother Jun, 1999, vol. 43, no. 6, p. 1449-58.

ITO, T., et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. En: Antimicrob Agents Chemother Jul, 2004, vol. 48, no. 7, p. 2637-51.

—. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. En: Drug Resist Updat Feb, 2003, vol. 6, no. 1, p. 41-52.

JARAMILLO, E. Resistencia bacteriana a los antibióticos en la Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital de Caldas, 1992-1994. En: Colombia Médica 1996, vol. 27, no., p. 69-76.

JERIC, P. E., et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates reveals the spreading of a new clone in Buenos Aires City. En: Medicina (B Aires) 2006, vol. 66, no. 1, p. 36-9.

KAASE, M., et al. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. En: Clin Microbiol Infect Jun, 2008, vol. 14, no. 6, p. 614-6.

KANEKO, J., and KAMIO, Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and

organization of the genes. En: Biosci Biotechnol Biochem May, 2004, vol. 68, no. 5, p. 981-1003.

KATAYAMA, Y., ITO, T., and HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. En: Antimicrob Agents Chemother Jun, 2000, vol. 44, no. 6, p. 1549-55.

—. Genetic organization of the 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*. En: Antimicrob Agents Chemother Jul, 2001, vol. 45, no. 7, p. 1955-63.

KHAZIEV, A. F., and MIKHAILOVA, N. A. [Molecular mechanisms of cytotoxic effect of alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*]. En: Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol Jan-Feb, 2007, vol., no. 1, p. 77-83.

KLUYTMANS, J., VAN BELKUM, A., and VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. En: Clin Microbiol Rev Jul, 1997, vol. 10, no. 3, p. 505-20.

KWON, N. H., et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. En: J Antimicrob Chemother Oct, 2005, vol. 56, no. 4, p. 624-32.

LAMERS, R. P., et al. Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates. En: PLoS One 2011, vol. 6, no. 1, p. e16426.

LINA, G., et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. En: Clin Infect Dis Nov, 1999, vol. 29, no. 5, p. 1128-32.

LINDSAY, J. A., and HOLDEN, M. T. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? En: Trends Microbiol Aug, 2004, vol. 12, no. 8, p. 378-85.

LOUREIRO MM, G. B., QUADRA M, PINHEIRO GS, ASENSI MD. . Study of multi-drug resistant microorganisms isolated from blood cultures of hospitalized newborns in Rio de Janeiro city, Brazil. En: Braz J Microbiol 2002, vol. 33. no., p. 73–8.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. En: N Engl J Med Aug 20, 1998, vol. 339, no. 8, p. 520-32.

—. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. En: J Clin Invest May, 2003, vol. 111, no. 9, p. 1265-73.

MALACHOWA, N., and DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. En: Cell Mol Life Sci Sep, 2010, vol. 67, no. 18, p. 3057-71.

MAREE, C. L., et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections. En: Emerg Infect Dis Feb, 2007, vol. 13, no. 2, p. 236-42.

MARIN, M., and GUDIOL, F. [beta-Lactam antibiotics]. En: Enferm Infecc Microbiol Clin Jan, 2003, vol. 21, no. 1, p. 42-55.

MATO, R., et al. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. En: Microb Drug Resist Summer, 1998, vol. 4, no. 2, p. 107-12.

MATSUOKA, M., et al. A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. En: FEMS Microbiol Lett Oct 15, 1998, vol. 167, no. 2, p. 221-7.

MAYOR, L., et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in Asuncion, Paraguay. En: J Clin Microbiol Jul, 2007, vol. 45, no. 7, p. 2298-300.

MCGAVIN, M. J., et al. Fibronectin receptors from *Streptococcus dysgalactiae* and *Staphylococcus aureus*. Involvement of conserved residues in ligand binding. En: J Biol Chem Nov 15, 1993, vol. 268, no. 32, p. 23946-53.

MCMANUS, M. C. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. En: Am J Health Syst Pharm Jun 15, 1997, vol. 54, no. 12, p. 1420-33; quiz 1444-6.

MELO, M. C., et al. Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. En: J Hosp Infect Dec, 2004, vol. 58, no. 4, p. 276-85.

MEMMI, G., et al. *Staphylococcus aureus* PBP4 is essential for beta-lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains. En: Antimicrob Agents Chemother Nov, 2008, vol. 52, no. 11, p. 3955-66.

MENDES, R. E., et al. Characterization of baseline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from phase IV clinical trial for linezolid. En: J Clin Microbiol Feb, 2010, vol. 48, no. 2, p. 568-74.

MENSA, J., GARCIA-VAZQUEZ, E., and VILA, J. [Macrolides, ketolides and streptogramins]. En: Enferm Infecc Microbiol Clin Apr, 2003, vol. 21, no. 4, p. 200-7; quiz 208, 219.

MONECKE, S., et al. Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Panton-Valentine leukocidin. En: Clin Microbiol Infect Mar, 2007, vol. 13, no. 3, p. 236-49.

—. The molecular epidemiology and evolution of the Panton-Valentine leukocidin-positive, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 in Western Australia. En: Clin Microbiol Infect Aug, 2009, vol. 15, no. 8, p. 770-6.

—. DNA microarray-based genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Eastern Saxony. En: Clin Microbiol Infect Jun, 2008, vol. 14, no. 6, p. 534-45.

MONGKOLRATTANOTHAI, K., et al. Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. En: Clin Infect Dis Oct 15, 2003, vol. 37, no. 8, p. 1050-8.

MORAN, G. J., et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. En: N Engl J Med Aug 17, 2006, vol. 355, no. 7, p. 666-74.

NUBEL, U., et al. Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: Proc Natl Acad Sci U S A Sep 16, 2008, vol. 105, no. 37, p. 14130-5.

O'BRIEN, F. G., et al. Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. En: J Clin Microbiol Jul, 2004, vol. 42, no. 7, p. 3185-90.

O'RIORDAN, K., and LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. En: Clin Microbiol Rev Jan, 2004, vol. 17, no. 1, p. 218-34.

OKUMA, K., et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. En: J Clin Microbiol Nov, 2002, vol. 40, no. 11, p. 4289-94.

OLARTE, N. M., et al. [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a Colombian hospital intensive care unit: phenotypic and molecular characterization]. En: Biomedica Jul-Sep, 2010, vol. 30, no. 3, p. 353-61.

OLIVEIRA, D., et al. Virtually all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the largest Portuguese teaching hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: the 'Iberian' and the 'Brazilian' clones of MRSA. En: Clin Microbiol Infect Jul, 1998, vol. 4, no. 7, p. 373-384.

OLIVEIRA, D. C., and DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: Antimicrob Agents Chemother Jul, 2002, vol. 46, no. 7, p. 2155-61.

OLIVEIRA, D. C., TOMASZ, A., and DE LENCASTRE, H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. En: Microb Drug Resist Winter, 2001, vol. 7, no. 4, p. 349-61.

OTTER, J. A., et al. Comparison of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from teaching hospitals in London and the USA, 2004-2006: where is USA300 in the UK? En: Eur J Clin Microbiol Infect Dis Jul, 2009, vol. 28, no. 7, p. 835-9.

OTTH, R. L., et al. [Antimicrobial susceptibility and resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from patients and carriers in Valdivia city, Chile]. En: Rev Chilena Infectol Jun, 2008, vol. 25, no. 3, p. 175-8.

PANAMERICANHEALTHORGANIZATION

2004 Annual report of the Monitoring / Surveillance Network for Resistance to Antibiotics, 2004.

PARK, P. W., et al. Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (ebpS) in *Staphylococcus aureus*. En: J Biol Chem Jun 28, 1996, vol. 271, no. 26, p. 15803-9.

PARKER, M. T., and HEWITT, J. H. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. En: Lancet Apr 18, 1970, vol. 1, no. 7651, p. 800-4.

PATTI, J. M., et al. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. En: J Biol Chem Mar 5, 1992, vol. 267, no. 7, p. 4766-72.

PEREZ-ROTH, E., et al. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. En: J Clin Microbiol Oct, 2004, vol. 42, no. 10, p. 4649-56.

PÉREZ, D., MÁTTAR, S., and MERCADO, M. Alta resistencia de los microorganismos nosocomiales en el Hospital San Jerónimo de Montería. En: Universitas Médica. 2003, vol. 44, no., p.

PLOY, M. C., et al. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. En: Lancet Apr 18, 1998, vol. 351, no. 9110, p. 1212.

POPOVICH, K. J., WEINSTEIN, R. A., and HOTA, B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? En: Clin Infect Dis Mar 15, 2008, vol. 46, no. 6, p. 787-94.

PREVOST, G., et al. Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. En: FEBS Lett Dec 4, 1995, vol. 376, no. 3, p. 135-40.

REYES, J., et al. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. En: Clin Infect Dis Dec 15, 2009, vol. 49, no. 12, p. 1861-7.

RIBEIRO, A., et al. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. En: Diagn Microbiol Infect Dis Nov, 2007, vol. 59, no. 3, p. 339-45.

ROBERTS, R. B., et al. Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. En: Microb Drug Resist Fall, 2000, vol. 6, no. 3, p. 245-51.

— . Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group. En: J Infect Dis Jul, 1998a, vol. 178, no. 1, p. 164-71.

— . Outbreak in a New York City teaching hospital burn center caused by the Iberian epidemic clone of MRSA. En: Microb Drug Resist Fall, 1998b, vol. 4, no. 3, p. 175-83.

ROGOLSKY, M. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. En: Microbiol Rev Sep, 1979, vol. 43, no. 3, p. 320-60.

ROSENDAL, K., et al. *Staphylococcus aureus* strains isolated in Danish hospitals from January 1st, 1966, to December 31st, 1974. En: Acta Pathol Microbiol Scand B Dec, 1976, vol. 84B, no. 6, p. 359-68.

ROSS, J. I., et al. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. En: Mol Microbiol Jul, 1990, vol. 4, no. 7, p. 1207-14.

ROUNTREE, P. M., and BEARD, M. A. Hospital strains of *Staphylococcus aureus*, with particular reference to methicillin-resistant strains. En: Med J Aust Dec 28, 1968, vol. 2, no. 26, p. 1163-8.

RUHLAND, G. J., and FIEDLER, F. Occurrence and structure of lipoteichoic acids in the genus *Staphylococcus*. En: Arch Microbiol 1990, vol. 154, no. 4, p. 375-9.

SA-LEAO, R., et al. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? En: J Clin Microbiol Jun, 1999, vol. 37, no. 6, p. 1913-20.

SAIMAN, L., et al. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. En: Clin Infect Dis Nov 15, 2003, vol. 37, no. 10, p. 1313-9.

SANCHES, I. S., et al. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. En: J Clin Microbiol May, 1995, vol. 33, no. 5, p. 1243-6.

SARAVOLATZ, L. D., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community-acquired outbreak. En: Ann Intern Med Jan, 1982, vol. 96, no. 1, p. 11-6.

SCHWALBE, R. S., STAPLETON, J. T., and GILLIGAN, P. H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. En: N Engl J Med Apr 9, 1987, vol. 316, no. 15, p. 927-31.

SEAS, C., et al. Oxacillin-resistant and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Lima, Peru. En: Infect Control Hosp Epidemiol Feb, 2006, vol. 27, no. 2, p. 198-200.

SEYBOLD, U., et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. En: Clin Infect Dis Mar 1, 2006, vol. 42, no. 5, p. 647-56.

SHOPSIN, B., et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. En: J Clin Microbiol Nov, 1999, vol. 37, no. 11, p. 3556-63.

SKOV, R., et al. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). En: Int J Antimicrob Agents Jan 6, 2012, vol., no., p.

SOLA, C., et al. Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Cordoba, Argentina. En: J Clin Microbiol Jan, 2006, vol. 44, no. 1, p. 192-200.

—. Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections. En: J Clin Microbiol Apr, 2002, vol. 40, no. 4, p. 1427-35.

—. High frequency of Panton-Valentine leukocidin genes in invasive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains and the relationship with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Cordoba, Argentina. En: Eur J Clin Microbiol Infect Dis Apr, 2007, vol. 26, no. 4, p. 281-6.

—. Emergence and dissemination of a community-associated methicillin-resistant Panton-Valentine leucocidin-positive *Staphylococcus aureus* clone sharing the sequence type 5 lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina. En: J Clin Microbiol May, 2008, vol. 46, no. 5, p. 1826-31.

SOLL, D. R., LOCKHART, S. R., and PUJOL, C.

2003 Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. *In* Manual of clinical microbiology. 8 edition. P.R. Murray, E.J.

Baron, J.H. Jorgensen, M. Pfaller, and Tenover, eds. Pp. 139-161. Washington, DC.: American Society for Microbiology.

SOSA, L. M., et al. Infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en niños en Bucaramanga, Colombia. En: Salud UIS 2010, vol. 42, no., p. 248-255.

STEWART, G. T., and HOLT, R. J. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. En: Br Med J Feb 2, 1963, vol. 1, no. 5326, p. 308-11.

STROMMINGER, B., et al. spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. En: J Clin Microbiol Feb, 2008, vol. 46, no. 2, p. 574-81.

TEIXEIRA, L. A., et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. En: J Clin Microbiol Sep, 1995, vol. 33, no. 9, p. 2400-4.

TENOVER, F. C., et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. En: Antimicrob Agents Chemother Jan, 2004, vol. 48, no. 1, p. 275-80.

TOSCANO, S. M., et al. Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in a University Hospital in Bucaramanga, Colombia. . En: 6th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases 2009, vol., no., p.

VAN BELKUM, A., et al. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. En: J Infect Dis Jun 15, 2009, vol. 199, no. 12, p. 1820-6.

VASQUEZ, D. Inhibitors of protein synthesis. En: FEBS Letters 1974, vol. 40, no., p. S63–84.

VELAZQUEZ-MEZA, M. E., et al. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. En: J Clin Microbiol Aug, 2004, vol. 42, no. 8, p. 3877-80.

VIVONI, A. M., et al. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. En: J Clin Microbiol May, 2006, vol. 44, no. 5, p. 1686-91.

VON EIFF, C., et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. En: N Engl J Med Jan 4, 2001, vol. 344, no. 1, p. 11-6.

VOSS, A., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. En: Eur J Clin Microbiol Infect Dis Jan, 1994, vol. 13, no. 1, p. 50-5.

VOYICH, J. M., et al. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? En: J Infect Dis Dec 15, 2006, vol. 194, no. 12, p. 1761-70.

WALSH, C. T. Vancomycin resistance: decoding the molecular logic. En: Science Jul 16, 1993, vol. 261, no. 5119, p. 308-9.

WEIGEL, L. M., et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. En: Science Nov 28, 2003, vol. 302, no. 5650, p. 1569-71.

WESTH, H., et al. The disappearance of multiresistant *Staphylococcus aureus* in Denmark: changes in strains of the 83A complex between 1969 and 1989. En: Clin Infect Dis Jun, 1992, vol. 14, no. 6, p. 1186-94.

WILLIAMS, R. E. Epidemic staphylococci. En: Lancet Jan 24, 1959, vol. 1, no. 7065, p. 190-5.

YAMAGUCHI, T., et al. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. En: Infect Immun Dec, 2001, vol. 69, no. 12, p. 7760-71.

—. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. En: Infect Immun Oct, 2002, vol. 70, no. 10, p. 5835-45.

ZHANG, H. Z., et al. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. En: Science Mar 9, 2001, vol. 291, no. 5510, p. 1962-5.