



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES *agr*, *mecA* Y PVL EN  
*Staphylococcus aureus* DE AISLAMIENTOS DE PORTADORES  
ASINTOMÁTICOS Y DE INFECCIONES NOSOCOMIALES

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
P R E S E N T A :  
**J E S Ú S V E G A R A M Í R E Z**

ASESORES: M.C. ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA  
Dra. NORMA VELÁZQUEZ GUADARRAMA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN



ATM: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:  
Identificación de los genes agr, mecA y PVL en Staphylococcus aureus de aislamientos de portadores asintomáticos y de infecciones nosocomiales.

que presenta el pasante: Jesús Vega Ramírez  
con número de cuenta: 40101752-6 para obtener el título de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán: Izcalli, Méx. a 01 de Febrero de 2008

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL MC. Andrea Angela Becerril Osnaya

SECRETARIO Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

PRIMER SUPLENTE MC. Ma. Guadalupe Avilés Robles

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Jonathan P. Paredes Juárez

---

*El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bacteriología Intestinal de la Unidad de Investigación en Microbiología Clínica del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"; bajo la dirección de la Dra. Norma Velázquez Guadarrama con el protocolo financiado por fondos federales y registrado con número HPM/2005/045 Isa 645.*

---

---

*Este trabajo contó con la asesoría de la M. en C.  
Andrea Angela Becerril Osnaya de la Sección de  
Ciencias de la Salud Humana, área de Microbiología  
de la FES- Cuautitlán C1 U.N.A.M.*

---

---

**DEDICATORIAS**

*A DIOS por seguir dándome vida*

*A la VIRGEN DE GUADALUPE por que me escuchó  
cuando quería hacer una carrera*

*A mi PAPÁ por su apoyo en todos los aspectos y por que fue  
el más paciente para que yo terminara la tesis, la cuál ha  
servido también mucho para que tuviéramos más  
acercamiento*

*A mi MAMÁ y a mis HERMANAS CINTHYA y LIDIA por que a  
pesar de todo las quiero mucho y se que no me dejaran solo y se que siempre  
puedo contar con su ayuda*

*A mis SOBRINOS DONOVAN y BRANDON porque cada vez  
que los veo se me alegra el corazón, aunque a veces me sacan más canas  
blancas*

*A la DRA. NORMA VELÁZQUEZ por situar su confianza en mi y por todo el  
soporte que me ha dado durante todo este tiempo, además de ser una persona a  
quien seguir por esa seguridad que siempre demuestra*

*A la MAESTRA ANDREA por su apoyo, por esperarme y por siempre  
decirme ¡¡Échale ganas!!*

*AL SENSEI y My FRIEND JUAN CARLOS por contarme sus  
vivencias de las cuáles he aprendido mucho, por cultivarme en otros  
temas, aunque ya se me olvidaron, por las veces que escuchábamos  
los Beatles, por las traducciones, por aquel viaje improvisado del  
cuál disfrute mucho, además de sus consejos y de su asesoría*

*A mi AMIGO GERARDO por todos aquellos consejos que  
me diste y me das y por saber escucharme, además de que  
sabes que te considero como mi hermano*

*A mi ABUELITA SOFÍA por que siempre me ha cuidado  
como uno de sus hijos y me ha dado todo su apoyo  
al igual que mi ABUELITA CARMEN*

---

*AGRADECIMIENTOS*

*A MARÚ y LETY por su apoyo y amistad que me brindan*

*AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA INTESTINAL por su ayuda y colaboración en la realización de esta tesis y por no hacerme tan pesado la estancia dentro del laboratorio*

*A mis compañeras de la facultad LUCÍA, ANA MARÍA, MARIANA, ARACELI, ITZEL, TONANTZIN, MÓNICA G., VANESSA, YURIANA y SELENE y a mis compañeros ARTURO, VÍCTOR, ASAF, ROBERTO y MARIANO, por el ánimo que siempre me dieron durante la carrera, además de soportarme; así como también de aquellos que formaron equipos conmigo lo cuáles se que tuvieron que ser muy pacientes en ciertas situaciones*

*A las QBP's ROSARIO y SANDRA por que siempre nos dábamos ánimos en aquellos momentos que no nos salían las PCR'S al principio y también por sus E-Mails de superación personal que me envían, estos últimos al igual que MARÚ*

*Y a todos aquellos que participaron en la realización, revisión e impresión de esta tesis*

*Muchas Gracias*

---

---

## ÍNDICE GENERAL

	PÁG.
I. INDICE DE FIGURAS.....	1
II. INDICE DE CUADROS.....	3
III. ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Antecedentes.....	9
1.2. Clasificación taxonómica.....	10
1.3. Características morfológicas y bioquímicas.....	11
1.4. Importancia clínica y epidemiológica.....	12
1.5. Antibióticos $\beta$ -lactámicos y grupo de los macrólidos, lincosamidas, y estreptogramina B (MLS <sub>B</sub> ).....	18
1.5.1. Antibióticos $\beta$ -lactámicos: generalidades, estructura química, clasificación y mecanismo de acción.....	18
1.5.2. Grupo de los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS <sub>B</sub> ): generalidades, clasificación, estructura química y mecanismo de acción.....	21
1.6. Resistencia antimicrobiana.....	24
1.6.1. Casete cromosomal estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ).....	24
1.6.2. Resistencia a oxacilina ( <i>gen mecA</i> ).....	27
1.6.3. Resistencia a macrólidos y lincosamidas.....	29
1.7. Distribución clonal de las cepas MRSA.....	30
1.8. Patogénesis e infecciones clínicas.....	32
1.9. Factores de virulencia.....	37
1.9.1. Estructura de la pared celular.....	37
1.9.2. Enzimas estafilocócicas.....	40
1.9.3. Toxinas estafilocócicas.....	42

---

---



---

---

1.9.4. Leucocidina de Panton-Valentine (PVL).....	47
1.10. Sistema quórum-sensing <i>agr</i> .....	49
1.11. Amplificación <i>in vitro</i> del DNA: Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.....	52
1.11.1. Definición y fundamento.....	52
1.11.2. Etapas del proceso.....	53
1.11.3. Factores importantes para la optimización de las reacciones de PCR.....	55
1.11.4. Limitaciones de la PCR.....	57
1.11.5. Variantes del método: PCR múltiple ( <i>Multiplex PCR</i> ).....	57
1.12. Electroforesis.....	59
1.12.1. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	59
1.12.1.1. Factores que influyen en el resultado de la electroforesis.....	60
1.12.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	63
1.12.2.1. Definición, fundamento y proceso.....	63
1.12.2.2. Variables que afectan la resolución del PFGE.....	64
1.12.2.3. Ventajas y desventajas de la aplicación de la PFGE en MRSA.....	66
1.13. Justificación.....	69
2. OBJETIVOS.....	70
2.1. Objetivo general.....	70
2.2. Objetivos particulares.....	70
3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.....	71
3.1. Validación de cepas <i>S. aureus</i> aislados de infecciones nosocomiales pertenecientes al cepario del laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) y de portadores asintomáticos.....	71

---

---

---

---

3.2. Pruebas de identificación bacteriana: macroscópica, microscópica y bioquímica.....	72
3.2.1. Identificación macroscópica.....	72
3.2.2. Identificación microscópica.....	72
3.2.3. Identificación bioquímica.....	72
3.3. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a oxacilina.....	72
3.4. Prueba de doble disco eritromicina-clindamicina.....	73
3.5. Técnicas de biología molecular.....	74
3.5.1. Extracción de DNA.....	74
3.5.2. Identificación del operón <i>agr</i> por PCR.....	75
3.5.3. Identificación del gen <i>mecA</i> y tipificación del <i>SCCmec</i> por PCR- Múltiple.....	76
3.5.4. Identificación de los genes PVL por PCR.....	77
3.5.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	78
3.5.6. Electroforesis en gel por campos pulsados.....	78
4. RESULTADOS.....	83
5. DISCUSIÓN.....	94
6. CONCLUSIONES.....	107
7. BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS.....	110
8. APÉNDICES.....	118

---

---

NÚMERO DE LA FIGURA	I. ÍNDICE DE FIGURAS	PÁG.
1	Morfología microscópica de <i>S. aureus</i> . Tinción de Gram, coco gram-positivo agrupado en racimos.....	11
2	Morfología colonial de <i>S. aureus</i> en agar sangre, observándose colonias doradas.....	12
3	Estructura molecular básica de las penicilinas.....	20
4	Estructura de la oxacilina y meticilina, dos antibióticos $\beta$ -lactámicos, pertenecientes a las penicilinas resistentes a penicilinasas, que inhiben la síntesis de la pared celular.....	21
5	Estructura de la eritromicina.....	22
6	Estructura de la lincomicina (Izquierda) y la clindamicina (Derecha).....	23
7	Representación de un fragmento de DNA cromosómico de MRSA... Mecanismo de resistencia de <i>S. aureus</i> a la meticilina.....	28
8	Representación esquemática de los elementos SCCmec tipos I, II, III y IVa.....	25
9	Estructura de la pared celular del estafilococo.....	38
10	El sistema accesorio gen regulador ( <i>agr</i> ) en estafilococos.....	51
11	La figura muestra los cuatro fenotipos que se observan al realizar la prueba de inducción a clindamicina de <i>S. aureus</i> por la prueba de difusión de doble disco en agar sangre.....	74
12	Ensayo de PCR para la identificación del gen <i>agr</i> en <i>S. aureus</i> .....	86
13	Identificación del gen <i>mecA</i> y de tipos y subtipos de SCCmec por PCR múltiple en <i>S. aureus</i> .....	87
14	Ensayo de PCR para la identificación de los genes PVL en <i>S. aureus</i> .....	89

---

---

15	(Izquierda). Patrones PFGE de DNA genómico digerido con <i>Sma</i> I de aislamientos MRSA de infecciones nosocomiales mostrando los tipos (A, B) y subtipos (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> ) asignados a cada aislamiento... (Derecha). Dendograma de los patrones PFGE de los tipos y subtipos obtenidos en este estudio.....	92
16	Patrones PFGE de DNA genómico digerido con <i>Sma</i> I de aislamientos MRSA de portadores asintomáticos mostrando los tipos (A, C) y subtipos (A <sub>1</sub> , A <sub>4</sub> , A <sub>5</sub> ) asignados a cada aislamiento... (Derecha). Dendograma de los patrones PFGE de los tipos y subtipos obtenidos en este estudio.....	93
17	Dendograma de PFTs con tipo de cepa (patrón más frecuente) y una cepa variante. También se muestra el MLST correspondiente para cada PFT.....	97
18	Perfiles PFGE de patrones de macrorestricción con <i>Sma</i> I de aislamientos de <i>S. aureus</i> de varios tipos USA.....	99

NÚMERO DEL CUADRO	II. ÍNDICE DE CUADROS	PÁG
I	Tipos de SCC <i>mec</i> y subtipos del tipo IV.....	26
II	Principales factores de virulencia de <i>S. aureus</i> .....	37
III	Número de aislamientos de infecciones nosocomiales originadas por <i>S. aureus</i> en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.....	71
IV	Valores de corte establecidos por la CLSI para la susceptibilidad a oxacilina por el método de difusión en disco.....	73
V	Iniciadores utilizados en la PCR múltiple para la identificación del gen <i>mecA</i> y el tipo de SCC <i>mec</i> .....	77
VI	Criterios para la interpretación de los patrones PFGE.....	80
VII	Pruebas realizadas para la validación de las cepas de <i>S. aureus</i> ...	83
VIII	Número de aislamientos MRSA y MSSA de infecciones nosocomiales y de portadores asintomáticos recuperados del HIMFG.....	84
IX	Distribución de las infecciones nosocomiales originadas por <i>S. aureus</i> en el HIMFG de acuerdo a su sensibilidad a oxacilina.....	84
X	Tipos de fenotipos MLS <sub>B</sub> presentes en cepas MRSA y MSSA de procesos nosocomiales recuperados de pacientes del HIMFG.....	85
XI	Tipos de fenotipos MLS <sub>B</sub> presentes en cepas MRSA y MSSA de portadores asintomáticos.....	86
XII	Número de aislamientos MRSA de infecciones nosocomiales y de portadores asintomáticos que mostraron el gen <i>mecA</i> y tipo de SCC <i>mec</i> que presento cada uno de ellos.....	88

---

---

### III. ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
AIP	Péptido autoinductor (“autoinducing peptide”)
BHI	Infusión cerebro corazón (“Brain Heart Infusion”)
C	Citosina
CA-MRSA	MRSA adquirida en la comunidad (“community-acquired MRSA”)
CAPD	Diálisis peritoneal ambulatoria continúa (“Continuous ambulatory peritoneal diálisis”)
CDC	Centros de Prevención y Control de Enfermedades (“Centers for Disease Control and Prevention”)
cm	Centímetros
dATP	Deoxiadenina trifosfato
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
dGTP	Deoxiguanina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótidos
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
ET	Toxina exfoliativa
EUA	Estados Unidos de América
G	Guanina
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HIMFG	Hospital Infantil de México “Federico Gómez”
IS	Secuencias de inserción
Kb	Kilobases
Mb	Megabases
mg	Miligramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MH	Mueller-Hinton

---



---

mL	Mililitro
MLST	“Multilocus sequence typing”
mM	Milimolar
MRSA	<i>S. aureus</i> meticilina resistente (“methicillin resistant <i>S. aureus</i> ”)
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
ORF	Marco de lectura abierta (“open reading frame”)
ORSA	<i>S. aureus</i> oxacilina resistente (“oxacillin-resistant <i>S. aureus</i> ”)
pb	Pares de bases
PTSAgs	Superantígenos toxina pirogénicos
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SCC <i>mec</i>	Casete cromosomal estafilocócico <i>mec</i> (“staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> ”)
PBP2a	Proteína fijadora de penicilina 2a (“Penicillin Binding Proteins”)
<i>ccr</i>	Casete cromosomal recombinasa (“cassette chromosome recombinase”)
<i>agr</i>	Accesorio gen regulador (“accessory gene regulador”)
PVL	Leucocidina de Pantón-Valentine (“Panton-Valentine leukocidin”)
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
MLS <sub>B</sub>	Macrólido, lincosamida y estreptogramina B (“macrolide, lincosamide, and streptogramin B”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”)
PFGE	Electroforesis en campo pulsado (“Pulse Field Gel Electrophoresis”)
cMLS	Fenotipo de resistencia constitutiva MLS
iMLS	Fenotipo de resistencia inducible MLS
MSSA	<i>S. aureus</i> meticilina sensible (“methicillin susceptible <i>S. aureus</i> ”)
HA-MRSA	MRSA adquirida en el hospital (“hospital-acquired MRSA”)

---



---

---



---

SEs	Enterotoxinas estafilocócicas (“staphylococcal enterotoxins”)
SFP	Intoxicación estafilocócica por alimentos (“staphylococcal food poisoning”)
<i>spa</i>	Proteína estafilocócica A (“staphylococcal protein A gene”)
SSF	Solución salina fisiológica
SSSS	Síndrome de piel escaldada estafilocócica (“staphylococcal scalded-skin syndrome”)
TAE	Tris ácido acético EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión de los iniciadores
T <sub>n</sub>	Transposones
tRNA	Acido Ribonucleico de transferencia
TSS	Síndrome de choque tóxico (“toxic shock syndrome”)
UFC	Unidad Formadora de Colonia
V	Volts
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
TSST-1	Toxina 1 de síndrome de choque tóxico (“toxic shock syndrome toxin 1”)
O <sub>2</sub>	Oxígeno



---

---

## RESUMEN

**Introducción.** *Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista causante de una gran variedad de infecciones intrahospitalarias y comunitarias a nivel mundial. La prevalencia actual de cepas de *S. aureus* meticilina resistente (“methicillin resistant *S. aureus*”, MRSA) está sujeta a variaciones geográficas. En hospitales mexicanos la prevalencia de cepas MRSA se ha incrementado rápidamente durante los últimos años. Se estima que ha cambiado del 7 al 30%. Del mismo modo, cada vez son más los reportes de aislamientos comunitarios resistentes a meticilina. El estado de portador de *S. aureus* en la nariz parece jugar un papel clave en la epidemiología y patogénesis de la infección en ambos ámbitos. El personal del hospital o pacientes colonizados, han sido identificados frecuentemente como la fuente de brotes. Estos microorganismos en su genoma han adquirido e integrado un elemento genético móvil conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* (“staphylococcal cassette chromosome *mec*”, SCC*mec*) que lleva el gen *mecA*, el cuál codifica para una proteína alterada denominada “proteína fijadora de penicilina” 2a (“Penicillin Binding Proteins”, PBP2a), enzima que decrece la afinidad a antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos. Los elementos SCC*mec* se clasifican en cinco tipos (I, II, III, IV, y V) en base a los polimorfismos genéticos en el complejo gen *mec* y en el tipo de complejo gen casete cromosomal recombinasa (“cassette chromosome recombinase”, *ccr*) que ellos poseen y son clasificados en subtipos de acuerdo a las diferencias en su región J (“junkyard”) del DNA. El SCC*mec* tipo II es el más prevalente en Estados Unidos de América (EUA), y además de llevar el gen *mecA* contiene múltiples determinantes de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos responsables de el fenotipo de multiresistencia comúnmente encontrado en aislamientos MRSA nosocomiales. Estudios recientes indican que los tipos II y IV se encuentran circulando en cepas MRSA en México. Sumado a la patogenicidad de *S. aureus*, muchos factores de virulencia son regulados por el operón accesorio gen regulador (“accessory gene regulador”, *agr*). Asimismo, la leucocidina de Panton-Valentine (“Panton-Valentine leukocidin”, PVL), es una leucocidina que causa destrucción de leucocitos y necrosis tisular, asociada principalmente a furúnculos, abscesos cutáneos, infecciones necróticas severas en piel y neumonía necrotizante, la cuál fue observada primeramente en la comunidad, no obstante, ahora es cada vez más reconocida en los hospitales. El **objetivo** del trabajo fué identificar los genes de virulencia *mecA*, *agr* y PVL en aislamientos de *S. aureus* procedentes de portadores asintomáticos y de infecciones nosocomiales.

**Metodología.** Se estudiaron 41 aislamientos de *S. aureus* de portadores asintomáticos y 29 de origen nosocomial. Todos los aislamientos fueron validados por técnicas bioquímicas de rutina y clasificados como meticilino sensibles y meticilino resistentes empleando el método de difusión en disco a oxacilina de acuerdo con el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI). Asimismo, también se determinó el fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (“macrolide, lincosamide, and streptogramin B”, MLS<sub>B</sub>) por la prueba de doble disco eritromicina-clindamicina. Se identificó el gen *mecA* y se caracterizó el tipo de SCC*mec* a las cepas MRSA por reacción en cadena de la polimerasa múltiple o PCR Múltiple (“Multiplex polymerase chain reaction”, *Multiplex PCR*). El operón *agr* y los genes PVL, fueron investigados en todos los aislamientos de *S. aureus* meticilina sensible (“methicillin-susceptible *S. aureus*”, MSSA) y MRSA por reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”, PCR). Se realizó la técnica de electroforesis en campo pulsado (“Pulse Field Gel Electrophoresis”, PFGE) para establecer la diversidad entre los aislamientos MRSA nosocomiales y de portadores. **Resultados.** Todos los aislamientos MSSA y MRSA presentaron el operón *agr*. Sólo cuatro aislamientos presentaron el gen PVL, dos de ellos fueron de portadores asintomáticos

---

---

(uno MSSA y el otro MRSA) y dos MRSA de procesos infecciosos nosocomiales. Los aislamientos MRSA PVL positivos presentaron el *SCCmec* subtipo IVa, mostrando características fenotípicas y genotípicas similares con respecto a las cepas comunitarias de EUA. El *SCCmec* tipo II fue predominante en los aislamientos MRSA en ambos casos, presentando multirresistencia, al igual que las cepas MRSA adquiridas en hospitales ("hospital-acquired MRSA", HA-MRSA) de EUA. Los patrones de restricción PFGE mostraron una cepa en común entre los aislamientos de portadores asintomáticos y de infecciones nosocomiales, mismos que llevaron el fenotipo de resistencia constitutiva MLS (cMLS) y el elemento *SCCmec* tipo II. **Conclusiones.** El encontrar aislamientos con características similares a las cepas de EUA, sugiere que la migración ha sido un factor importante para que estas se encuentren circulando también aquí en México. La prevalencia de una misma cepa MRSA en ambos ámbitos, obliga a tomar medidas de control y conocer el estado de portación de los pacientes y personal de la salud, para evitar la diseminación y permanencia del microorganismo dentro del hospital. Finalmente, se observó en este estudio una asociación entre el fenotipo de resistencia MLS<sub>B</sub> y el tipo de *SCCmec*, lo cual sugiere que la prueba de doble disco hasta ahora puede ayudar en la orientación del tipo de *SCCmec* aunque no en absoluto, permitiéndonos evitar tratamientos que induzcan mayor resistencia sobre todo en los de origen comunitario.

---

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La mortalidad de pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en la era pre-antibiótica excedió en un 80%, y más del 70% desarrollaron infecciones metastásicas. La introducción de la penicilina a principios del año 1940 como tratamiento en las infecciones causadas por *S. aureus* abatió de manera importante las infecciones ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, a principios del año 1942, estafilococos penicilina resistentes fueron reconocidos, primero en hospitales y subsecuentemente en la comunidad. Para 1946, en Inglaterra se observó que aproximadamente 60% de los aislamientos de estafilococos fueron resistentes a penicilina y para mediados de 1950, los aislamientos de *S. aureus* mostraron niveles más elevados de resistencia. Los primeros aislamientos de *S. aureus* multirresistentes fueron recuperados en 1957. A principios de los 60's los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de antibióticos disponibles. Ahora, se reporta una resistencia a la penicilina del 80-93% o más en aislamientos de *S. aureus*, independientemente de la colocación clínica.<sup>4,35,61</sup>

Debido a la resistencia a la penicilina de las cepas de *S. aureus*, a finales de los años 50 se introdujeron cefalosporinas estables a penicilinasas y penicilinas semisintéticas. Entre éstas estuvo la meticilina (derivado semisintético de la penicilina), como antibiótico de elección en el tratamiento de *S. aureus*. Esta droga fue introducida en Europa en 1959 para superar el problema de *S. aureus* penicilina resistente debido a la producción de  $\beta$ -lactamasas (penicilinasas). Sin embargo, cepas de *S. aureus* meticilina resistente ("methicillin resistant *S. aureus*", MRSA), fueron identificados tan pronto después de su introducción en la práctica clínica.<sup>4,61,68</sup>

El primer caso MRSA fue reportado en Inglaterra en 1961.<sup>23,53</sup> En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes en todo el mundo.<sup>4,61</sup>

---

---

La emergencia de cepas resistentes a penicilina, meticilina y recientemente cepas de alto nivel de resistencia a vancomicina, ha demostrado que *S. aureus* pudo fácilmente adaptarse a la presión antibiótica y adquirir genes de resistencia de origen heterólogo.<sup>62</sup> La adquisición de esta resistencia se debe principalmente al intercambio de manera horizontal de los genes de resistencia, es decir, el paso de los genes de cepas resistentes a cepas susceptibles que son transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones (Tn) y secuencias de inserción (IS).<sup>4</sup>

Aislamientos de *S. aureus* meticilina sensible (“methicillin susceptible *S. aureus*”, MSSA) tienen el potencial de convertirse en meticilino resistente debido al adquisición en su genoma de un elemento genético móvil de 21 a 67 kb conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* (“staphylococcal cassette chromosome *mec*”, SCC*mec*) que lleva el gen de resistencia a meticilina *mecA* y otras determinantes de resistencia a antibióticos,<sup>4,29,53,68</sup> demostrado por Katayama *et al.*<sup>29</sup> Desde entonces, las cepas MRSA se han convertido, extendido y establecido como importantes patógenos hospitalarios a nivel mundial y es un problema amenazador de salud pública.<sup>47,68</sup> Sin embargo, a finales de los años 90, emergieron cepas MRSA en adultos y niños sanos en las comunidades. Estas cepas originaron infecciones en la comunidad. La prevalencia de estas infecciones ha aumentado significativamente en los últimos años.<sup>4</sup> Ahora, dos tipos principales de MRSA circulan en la comunidad: (i) cepas MRSA adquiridas en hospitales (“hospital-acquired MRSA”, HA-MRSA) y (ii) cepas MRSA adquiridas en la comunidad (“community-acquired MRSA”, CA-MRSA).<sup>4,48</sup>

## 1.2. Clasificación taxonómica

El Volumen 3 de la segunda edición del Manual Bergey agrupa a *S. aureus* dentro de las bacterias Gram positivas con DNA de bajo contenido en G + C, miembro del *phylum Firmicutes*; Clase: *Bacilli*; Orden: Bacillales; Familia: *Staphylococcaceae*; Género: *Staphylococcus*,<sup>46</sup> el cual contiene más de 30 especies diferentes, y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del

---

---

hombre; no tienen otros hábitats importantes, excepto cuando están involucradas en infecciones.<sup>61</sup>

### 1.3. Características morfológicas y bioquímicas

El nombre de estafilococos fue designado por Sir Alexander Ogston después de utilizar la expresión griega *Staphyle* (racimo de uvas) para describir las características microscópicas de crecimiento en grupos semejantes a uvas (Ver fig. 1).<sup>61</sup> *S. aureus* es un coco grampositivo de 0.8-

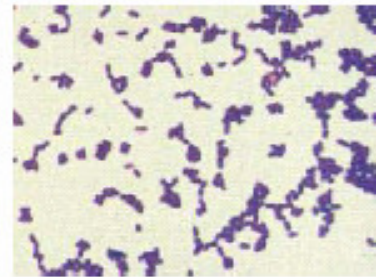


Figura 1. Morfología microscópica de *S. aureus*. Tinción de Gram, coco grampositivo agrupado en racimos.

1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, no móvil. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. No forma esporas, puede encontrarse

solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Son catalasa positivos, prueba que permite su distinción del género *Streptococcus* y algún otro genero de cocos grampositivos; son oxidasa negativos, fermentan la glucosa y poseen ácido teicoico en sus paredes celulares. A diferencia de otros estafilococos comunes, *S. aureus* produce la enzima *coagulasa*, por lo que se conoce también como estafilococo coagulasa positivo.<sup>4,36,45,46,61</sup>

Los estafilococos forman en agar sangre colonias grandes de 1 a 3 mm, opacas, blancas o amarillentas por la producción de un típico pigmento amarillo debido a la producción de carotenoides; sin embargo, se presentan frecuentemente variantes no pigmentadas en muchas cepas. Generalmente producen una hemólisis total de la sangre (hemólisis beta,  $\beta$ -hemólisis) (Ver fig. 2).<sup>4,45,61</sup>



Figura 2. Morfología colonial de *S. aureus* en agar sangre, observándose colonias doradas.

#### 1.4. Importancia clínica y epidemiológica

Los hábitats más comunes de *S. aureus* son el tracto respiratorio alto, especialmente la nariz y faringe, y la superficie de la piel, formando parte de la flora normal en muchos individuos, incluyendo pacientes y personal del hospital.<sup>30,36</sup> El porte de *S. aureus* en la nariz parece jugar un papel clave en la epidemiología y patogénesis de la infección. Estudios selectos han mostrado que la nariz es el área mas segura de la cuál este organismo puede ser aislado.<sup>30</sup>

Un *portador* es un individuo infectado por un patógeno que no muestra signos de una enfermedad clínica. Muchas de las infecciones estafilocócicas resultan de la transferencia del estafilococo en flora normal de un individuo infectado pero asintomático a un individuo susceptible, por lo que los portadores son una fuente potencial de infección para otros y son importantes críticamente para el brote de enfermedades. Los portadores pueden ser individuos en un período de incubación de la enfermedad. En cualquier caso el estado del portador precede el desarrollo de los síntomas actuales. Estos individuos son fuentes primarias de infecciones respiratorias porque ellos todavía no están enterados de su infección y no están tomando alguna precaución contra otras infecciones. Para tales *portadores agudos*, el estado del portador dura sólo un corto período de tiempo. Por otra parte, los *portadores crónicos* pueden permanecer infectados y llevar enfermedades por períodos extendidos de tiempo. Los portadores crónicos usualmente parecen perfectamente saludables. Ellos pueden ser individuos con

---

---

infecciones inaparentes o individuos recuperados de una enfermedad clínica pero portando aún patógenos viables.<sup>36</sup>

A través del tiempo, tres patrones de portadores han sido distinguidos. Algunos individuos casi siempre llevan un tipo de cepa y son nombrados *portadores persistentes*. Otra proporción de la población trae *S. aureus* intermitentemente, y las cepas cambian variando con frecuencia. Tales personas son llamadas *portadores intermitentes*. Finalmente, están los denominados *no portadores*, que es gente que casi nunca lleva el *S. aureus*. El portador de tipo persistente es más común en niños que en adultos, y mucha gente cambia su patrón entre la edad de 10 y 20 años. Se ha visto que la persistencia del microorganismo tiene un efecto protector sobre la adquisición de otras cepas, al menos durante la hospitalización.<sup>30</sup> Kluytmans *et al.*,<sup>30</sup> en su revisión sobre la portación nasal hace referencia a ésta su clasificación, en la cuál el portador persistente es quien presenta más de ocho cultivos positivos en 10 exámenes, el intermitente, quien presenta entre 60 y 80% de cultivos positivos y el ocasional, quien tiene de 10 a 40% de cultivos positivos.

La prevalencia e incidencia del acarreo nasal de *S. aureus* varía de acuerdo a la población estudiada.<sup>30</sup> En Estados Unidos de América (EUA) los Centros de Prevención y Control de Enfermedades (“Centers for Disease Control and Prevention”, CDC), han realizado recientemente un estudio nacional para determinar la prevalencia y colonización de *S. aureus* y cepas MRSA en la población. En este estudio se encontró que el 32.4% de la población es portadora de *S. aureus* y el 0.8% está colonizado con cepas MRSA. Se estima que 89.4 millones de estadounidenses presentan *S. aureus* y 2.3 millones son portadores de cepas MRSA. La prevalencia de colonización con *S. aureus* es mayor entre la población de 6 a 11 años de edad. Además, los varones y la población blanca no hispana presentan mayor riesgo de colonización. La colonización con cepas MRSA fue mayor en mujeres mayores de 60 años. La población negra tiene mayor riesgo de ser colonizada con cepas MRSA en comparación con los estadounidenses de origen mexicano. En este estudio no se encontró una

---

---

asociación estadísticamente significativa entre la colonización con *S. aureus* o cepas MRSA con otros factores epidemiológicos como pobreza, educación, nacimiento fuera de los EUA, servicio militar, diabetes y condición dermatológica.<sup>4</sup>

Las cepas MSSA y MRSA ingresan al medio hospitalario a través de pacientes, visitantes o trabajadores asistenciales.<sup>34</sup> El cruzamiento de infecciones de paciente a paciente o de personal del hospital y pacientes, presenta un peligro constante.<sup>36</sup> Históricamente, *S. aureus* ha sido un ejemplo de un microorganismo implicado en la infección cruzada y ahora es uno de los patógenos más importantes y diseminados dentro del hospital. El personal del hospital o pacientes colonizados, han sido identificados frecuentemente como la fuente de brotes.<sup>30</sup> Sin embargo, otros datos muestran que muchas infecciones por *S. aureus* tienen su origen en la flora endógena de los pacientes.<sup>30,63</sup>

Las infecciones hospitalarias son llamadas *infecciones nosocomiales* (del latín *nosocomium* que significa “hospital”),<sup>36</sup> y son un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social. Son de importancia clínica y epidemiológica debido a que presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad. Las infecciones nosocomiales se definen como aquellas infecciones que no estaban presentes ni en periodo de incubación al momento en que el paciente ingresó al hospital. En EUA se reporta una incidencia promedio del 3 al 5%. En México se tiene reportado un promedio del 10 al 15%. El impacto más importante de este problema es la mortalidad, la cuál se estima en promedio de un 5%. El área hospitalaria con mayor frecuencia de infecciones nosocomiales es la Unidad de Terapia Intensiva. Las infecciones más frecuentes son en vías urinarias, seguidas por la de herida quirúrgica, bacteriemias y neumonías.<sup>4</sup>

*S. aureus* y los estafilococos coagulasa negativos representan el 21% de los 4 millones de infecciones adquiridas anualmente en los hospitales de EUA. Las infecciones nosocomiales por *S. aureus* representan un gasto elevado. Además del sustancial gasto económico, existe una morbilidad y una mortalidad significativas asociadas con las infecciones estafilocócicas, particularmente con



---

---

las infecciones invasivas, donde el rango de mortalidad en EUA se encuentra entre el 19 y 34%.<sup>4</sup>

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) con datos provenientes de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades, reportó que en el período de 1997-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y cuarto lugar en mortalidad. En un estudio realizado en 21 hospitales pediátricos, se encontró que *S. aureus* ocupa el cuarto lugar de microorganismos causantes de infecciones nosocomiales.<sup>4</sup> Por último, diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales en México indicaron que del 8.3 al 36% de esas infecciones fueron atribuibles a *S. aureus*.<sup>61</sup>

Dentro de los factores que afectan el éxito de la transmisión nosocomial de *S. aureus*, son los siguientes: factores del hospedero, características fenotípicas y genotípicas de las cepas, esquemas de tratamiento antimicrobiano y medidas de control de las infecciones implementadas en las instituciones. Algunas cepas de *S. aureus*, denominadas epidémicas, parecen tener la capacidad de distribuirse de manera exitosa dentro de los hospitales y causar infecciones serias en los pacientes.<sup>61</sup>

Las infecciones hospitalarias por *S. aureus* se debe particularmente a la prevalencia o tiempo de estancia hospitalaria de pacientes enfermos, procedimientos prequirúrgicos, quirúrgicos o invasivos, presencia de catéteres intravasculares, tubos endotráqueales o prótesis y la permanencia en lugares de alto riesgo; unidades de cuidados intensivos, sala de neonatos y unidades prequirúrgicas, entre otras.<sup>21,61</sup>

Entre las infecciones nosocomiales en la actualidad se tiene un aumento en el número de brotes epidémicos debido a cepas de *S. aureus* que son resistentes a la meticilina.<sup>4</sup> MRSA es ahora una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales bacterianas, considerando que el 40-70% de las infecciones por *S. aureus* son en unidades de cuidado intensivo.<sup>67</sup>

---

---

En general está aceptado que las cepas MRSA pueden prosperar en el ambiente hospitalario debido a la presión selectiva por el uso de antibióticos, pero tiene una baja prevalencia al exterior debido al “fitness cost” de resistencia.<sup>10</sup>

Una infección por HA-MRSA se define como aquella infección que está ocurriendo en un paciente cuyo aislamiento MRSA fue cultivado después de más de 48 horas de admisión y quién tuvo una historia de hospitalización, cirugía, diálisis, o residencia a largo termino en un centro de salud facilitándolo dentro de los 6 meses anteriores a la fecha de cultivo, o quién tuvo una línea intravenosa intravascular, catéter, o cualquier otro dispositivo médico percutáneo presente en el tiempo en el que el cultivo fue tomado.<sup>23</sup>

La adquisición del organismo en un hospital o en una instalación de cuidado a largo término, esta bien documentado en niños y adultos. A pesar de unos cuantos datos descriptivos, los factores de riesgo predisponentes para adquirir una infección por MRSA aparte de los ya mencionados para *S. aureus* en general, incluyen la exposición recurrente o prolongada a antibióticos. En adultos, otros factores de riesgo identificados para la infección por MRSA incluyen enfermedades crónicas de hígado y pulmón, enfermedades vasculares, diálisis, malignidad, o exposición prolongada a agentes antimicrobianos.<sup>21</sup>

La resistencia a meticilina confiere resistencia a derivados  $\beta$ -lactámicos y cefalosporinas; y en general, las cepas HA-MRSA son el patógeno que presenta resistencia a múltiples antibióticos (cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, e incluso, quinolonas), además de ser la más comúnmente identificada en los hospitales de EUA.<sup>4,34,61</sup> Estos patrones de resistencia limitan las opciones terapéuticas contra las infecciones de MRSA; la vancomicina y la teicoplanina son las últimas alternativas terapéuticas. Sin embargo, las primeras cepas de *S. aureus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina fueron reportadas en Japón y EUA en los años 90; a partir de entonces han aparecido más informes en la literatura.<sup>4,61</sup>

---

---

El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (“National Nosocomial Infectious Surveillance System”, NNIS) de EUA determinó que en pacientes hospitalizados la prevalencia de cepas MRSA se incrementó del 4% en 1980 a 31.9% en 1996. En 2001 se tenía un 55% de prevalencia y para el 2004, llegó al 60.7%. En algunos hospitales se han reportado incidencias hasta del 80%. La prevalencia actual de cepas MRSA está sujeta a variaciones geográficas. Por ejemplo, en Europa se tienen porcentajes elevados, como un 58% en Italia y 54% en Portugal. En el Reino Unido en 1992 menos del 3% de las cepas aisladas de *S. aureus* provenientes de septicemias fueron meticilina resistentes, pero en la actualidad se tiene una tasa cercana al 40%. En Japón se tiene un 70%. Por otro lado, los países escandinavos tienen un porcentaje muy bajo de cepas MRSA, alrededor del 1%.<sup>4,61</sup>

En México existe un número limitado de estudios sobre la prevalencia de cepas MRSA. De acuerdo a algunos estudios realizados en los años 1980, 1990, y 2000, la prevalencia de cepas MRSA en hospitales mexicanos se ha incrementado rápidamente durante los últimos años. Se estima que ha cambiado del 7 al 30%.<sup>4,62</sup> En 2002, el Instituto Nacional de Pediatría (INP) y el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG), registran una frecuencia de la resistencia a oxacilina de *S. aureus* de 14.2%.<sup>5</sup> Sin embargo, en un estudio realizado en un hospital pediátrico se encontró que la frecuencia de cepas MRSA varió del 17 al 23% de 1997 a 2001. En 2002 bajó al 4% y en 2003 se tenía un 0%. La disminución en la frecuencia de cepas MRSA desde el 2002, reportan que se debió probablemente a la intervención de un comité de control de infecciones en el hospital a finales del 2001.<sup>62</sup> Por último, en 2005 el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) reporta que *S. aureus* aislado de cultivos de sangre presentó una sensibilidad promedio a oxacilina de 96%, mucho mayor que lo informado en otros estudios realizados en México.<sup>6</sup>

Este panorama epidemiológico ha obligado a que la mayoría de los países tomen medidas para tratar de controlar las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina.<sup>4</sup>

---

---

## **1.5. Antibióticos $\beta$ -lactámicos y grupo de los macrólidos, lincosamidas, y estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>)**

### **1.5.1. Antibióticos $\beta$ -lactámicos: generalidades, estructura química, clasificación y mecanismo de acción**

El mecanismo más común de actividad antibiótica es la interferencia con la síntesis de la pared celular bacteriana. La mayoría de los antibióticos que tienen este mecanismo de acción se clasifican como  $\beta$ -lactámicos (p. ej., penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenems, monobactámicos e inhibidores de la  $\beta$ -lactamasa), debido a que comparten una estructura en común de un anillo  $\beta$ -lactámico de cuatro miembros, nitrogenado en el centro de la estructura (Ver fig. 3). Esta clase de fármacos comprende el grupo más grande de agentes antibacterianos y docenas de derivados están disponibles para el uso clínico. La popularidad de estos agentes surge de su efecto por lo general bactericida y la relativamente baja toxicidad para los seres humanos, y también porque sus estructuras moleculares pueden manipularse para lograr mayor actividad para aplicaciones terapéuticas más amplias.<sup>17,41</sup>

Estos agentes antimicrobianos sólo actúan sobre las bacterias en crecimiento.<sup>40,41</sup> El anillo  $\beta$ -lactámico es la clave del *mecanismo de acción* de estos antibióticos, que generalmente son bactericidas que interfieren en la síntesis pero no el recambio (degradación) del peptidoglicano de la pared celular, debido a que se unen a receptores enzimáticos situados en la cara externa de la membrana bacteriana involucradas en su síntesis.<sup>17,40,41,49</sup> La mayoría de las células bacterianas no pueden sobrevivir una vez que perdió la capacidad para producir y mantener su capa de peptidoglicano.<sup>17</sup>

Los receptores enzimáticos reciben el nombre de “proteínas fijadoras de penicilina” (“Penicillin Binding Proteins”, PBP) de las cuáles existen siete tipos o más en diferentes microorganismos (p. ej., carboxipeptidasas, transpeptidasas, endopeptidasas). Las transpeptidasas con frecuencia son las más importantes para la supervivencia. Estas enzimas son las que están implicadas en la fase final

---

---

de la formación de la pared celular: la transpeptidación entre las cadenas de glucopéptidos que produce la formación de puentes peptídicos para formar las hojas de peptidoglicano, que a su vez están entrelazadas entre si dando una estructura entrelazada en multicapa bastante rígida, denominada sáculos de *mureína*. Cuando los  $\beta$ -lactámicos se unen a estas PBP, la síntesis de la pared celular se detiene.<sup>17,40,41,49</sup> Las proteínas PBP también tienen la función de reorganizar la pared durante el crecimiento y la división celular.<sup>40</sup>

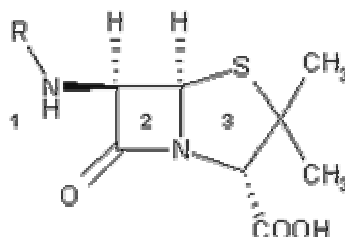
El efecto bactericida final de los  $\beta$ -lactámicos se debe a dos factores:<sup>17,40,49</sup>

1. Al contener las bacterias una pared celular defectuosa y poco rígida el microorganismo estalla por la entrada de agua que se produce como consecuencia de la alta presión osmótica interna.
2. La inactivación de un inhibidor de enzimas autolíticas de la pared bacteriana (autolisinas) que provoca un metabolismo desequilibrado que lleva a la lisis celular. Las autolisinas son enzimas finamente reguladas que en condiciones normales de crecimiento participan en el recambio o renovación de la pared celular (cell wall turnover) y en la separación de las bacterias después de la división celular.

Asimismo, las penicilinas se pueden unir a una o varias de las PBP porque actúan como análogos del sustrato de la transpeptidación normal. Esto produce la inactivación en forma irreversible de la PBP debido a que las penicilinas se comportan como agentes acilantes que actúan sobre el sitio activo de las enzimas.<sup>40</sup>

La penicilina fue descubierta en 1928, por Alexander Fleming al observar que una placa de cultivo en la que se cultivaban estafilococos se había contaminado con un hongo del género *Penicillium* y que el crecimiento bacteriano en las proximidades del hongo se había inhibido. Aisló entonces el hongo en cultivo y demostró que producía una sustancia bacteriana, que denominó penicilina.<sup>49</sup>

- 
- 
1. Grupo amino libre
  2. Anillo  $\beta$ -lactámico
  3. Anillo tiazólido



R. Radical que determina las propiedades farmacológicas

Figura 3. Estructura molecular básica de las penicilinas.

Todas las penicilinas tienen básicamente la estructura del ácido 6-aminopenicilánico (obtenido a partir de cultivos del moho *Penicillium chrysogenum*) que tiene un anillo tiazólido, con un grupo amino libre, unido al anillo  $\beta$ -lactámico.<sup>40,41</sup>

La modificación bioquímica de este compuesto proporciona derivados que tienen una labilidad menor en medio ácido y una mayor absorción en el tracto gastrointestinal, mayor resistencia a las penicilinasas o un mayor espectro que incluye bacterias gram negativas.<sup>41</sup> Así, las penicilinas pueden clasificarse en relación a su espectro de actividad antimicrobiana en: 1) Penicilinas naturales (penicilina G, penicilina V); 2) Penicilinas resistentes a penicilinasas (nafcilina, meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina); 3) Penicilinas de amplio espectro (ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina); y 4)  $\beta$ -lactámico con inhibidor de  $\beta$ -lactamasa (amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam).<sup>40,41</sup>

La **meticilina** fue la primera penicilina semisintética resistente a penicilinasas que se introdujo para uso clínico, por vía parenteral. Este fármaco fue **altamente eficaz** contra infecciones estafilocócicas, pero se asoció a la ocurrencia de **nefritis intersticial** y su uso fue discontinuado. Posteriormente apareció la **oxacilina** también para uso parenteral y **otras penicilinas resistentes a penicilinasas**. La oxacilina y la nafcilina reemplazaron exitosamente a la meticilina y fueron usualmente recomendadas para el tratamiento de **infecciones estafilocócicas**

---

serias. Sin embargo, como ya se mencionó con anterioridad, surgieron estafilococos resistentes a estas penicilinas resistentes a penicilinasas.<sup>44</sup>

Este grupo de penicilinas poseen una cadena lateral acilica que inhibe la acción de la penicilinasas y por consiguiente previenen la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico (Ver fig. 4).<sup>44</sup>

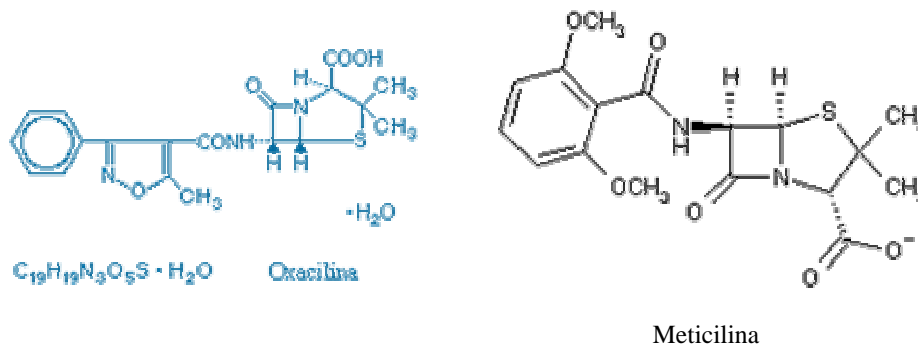


Figura 4. Estructura de la oxacilina y metcilina, dos antibióticos  $\beta$ -lactámicos, pertenecientes a la penicilinas resistentes a penicilinasas, que inhiben la síntesis de la pared celular.

### 1.5.2. Grupo de los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>): generalidades, clasificación, estructura química y mecanismo de acción

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (“macrolide, lincosamide, and streptogramin B”, MLS<sub>B</sub>) son antibióticos químicamente distintos pero tienen un modo similar de acción, inhiben la síntesis proteica bacteriana.<sup>16,32</sup>

*Macrólidos.* La eritromicina, un derivado de *Streptomyces erythreus*, es el prototipo de la familia de los macrólidos.<sup>27,41</sup>

El término «macrólidos» se relaciona con la estructura, un anillo de lactona macrocíclico de tamaño variable unido a un mínimo de dos amino y/o azúcares neutrales.<sup>27,32,41,49</sup> Los macrólidos comercialmente disponibles o en desarrollo clínico pueden ser divididos en macrólidos con un anillo de lactona de 14-, 15-, y 16-miembros. La eritromicina es un macrólido de 14-miembros (Ver fig. 5).<sup>19,32</sup>

---

---

Estas clases difieren en sus propiedades farmacocinéticas y en su respuesta a mecanismos de resistencia bacteriana.<sup>32</sup>

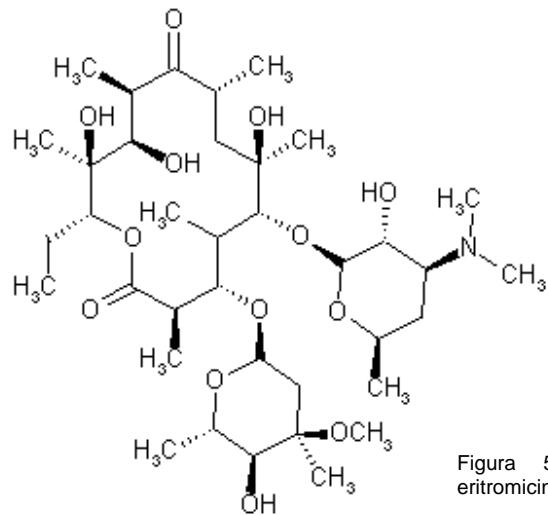


Figura 5. Estructura de la eritromicina.

Los macrólidos son antibióticos que pueden ser bacteriostáticos o bactericidas y el efecto depende de la concentración y del tipo de microorganismo. Los macrólidos ejercen su acción mediante la unión reversible a los receptores presentes en la subunidad 50S del ribosoma de las células bacterianas, lo cual bloquea la elongación de la cadena polipeptídica, actuando específicamente en la reacción de translocación del peptidil-tRNA del sitio A al sitio P.<sup>17,40,41,49</sup>

El espectro antimicrobiano de eritromicina es muy similar al de la penicilina y se ha demostrado que es una alternativa segura y eficaz en los pacientes alérgicos a penicilina. La eritromicina, es un agente que es principalmente activo contra aerobios grampositivos. En general resulta inactivo frente a aerobios gramnegativos con excepción de especies *Neisseria*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Campylobacter* y *Legionella*. La sensibilidad de anaerobios gramnegativos no es confiable. La eritromicina también actúa contra *Rickettsia*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma* y *Chlamydia*.<sup>27,41,49</sup>

Las modificaciones en la estructura del macrólido ha dado lugar al desarrollo de nuevos fármacos, por ejemplo, la azitromicina y la claritromicina.<sup>41</sup>



---

---

*Lincosamidas*. La lincomicina, el compuesto original de la clindamicina, se aisló de los productos de fermentación de un estreptomiceto del suelo encontrado en Lincoln, Nebraska, denominado *Streptomyces lincolnensis*.<sup>27,41</sup> La clindamicina es un derivado 7-cloro-7-desoxi de la lincomicina (Ver fig. 6). Esta familia de agentes se conoce como las lincosamidas.<sup>27,40,41</sup>

Al igual que los macrólidos, la clindamicina bloquea la elongación de las proteínas al unirse a la subunidad 50S del ribosoma. Inhibe la peptidiltransferasa al interferir en la unión del complejo aminoácido-acil-tRNA.<sup>40,41</sup> Debido a que el lugar de unión es el mismo que el de los macrólidos y el cloranfenicol, los tres tipos de fármacos podrían competir cuando se administran de manera simultánea.<sup>49</sup>

La actividad antibacteriana de las lincosamidas es muy similar a la de la eritromicina. Por lo regular, la clindamicina es más activa que la lincomicina. Estos agentes casi siempre muestran actividad contra organismos grampositivos, incluidos muchos estafilococos resistentes a penicilinas, excepto los enterococos, pero son inactivos frente a los aerobios gramnegativos con excepción de *H. influenzae*. También atacan bacterias anaerobias, sobre todo cocos y bacilos gramnegativos.<sup>27,41,49</sup>

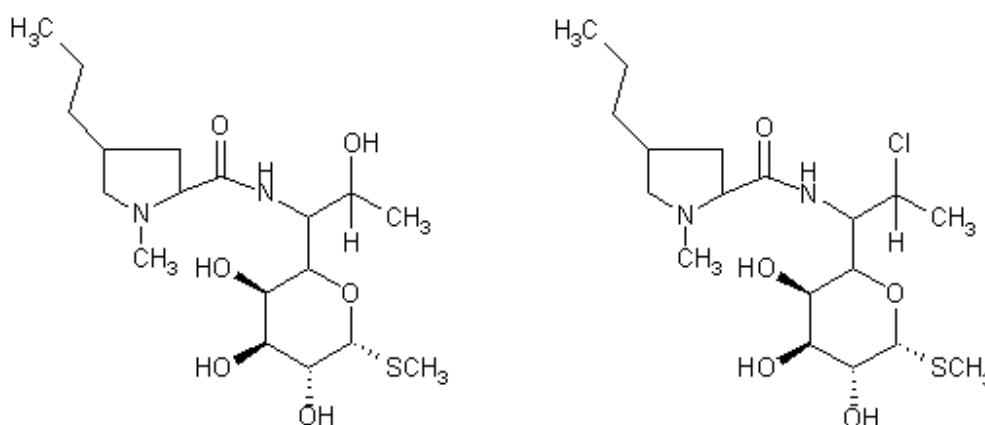


Figura 6. Estructura de la lincomicina (Izquierda) y la clindamicina (Derecha).

---

---

## 1.6. Resistencia antimicrobiana

### 1.6.1. Casete cromosomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

SCC*mec* es una isla genómica (Gisland), que se inserta al final del extremo 3' de un marco de lectura abierta ("open reading frame", ORF), denominado *orfX*, en un sitio único (*attB<sub>SCC</sub>*), cerca del origen de replicación de *S. aureus*.<sup>4,9,53</sup> El SCC*mec* esta formado por el complejo gen *mec*, el complejo gen casete cromosomal recombinasa ("cassette chromosome recombinase", *ccr*) y las regiones J ("junkyard"). El complejo gen *mec* esta compuesto de los genes IS431*mec*, *mecA*, y un conjunto de genes reguladores, intactos o delecionados, *mecR1* y *mecI*. La secuencia de inserción IS431 facilita la adquisición de resistencia a los antibióticos y la resistencia al mercurio. El complejo *ccr* comprende los genes *ccr*, *ccrA* y *ccrB* en combinación (*ccrAB*) o *ccrC* solo, adyacentes a ORFs. Los genes *ccrAB* y *ccrC* codifican recombinasas necesarias que median la integración del elemento SCC*mec* dentro del cromosoma y su escisión exacta; y son, por lo tanto, responsables para su movilidad. El resto del elemento SCC*mec* esta compuesto de regiones J (J1, J2, y J3) que están localizadas entre y alrededor de los complejos *mec* y *ccr* y contienen varios genes o pseudogenes que no parecen ser esenciales o útiles para la bacteria, aunque notables excepciones incluyen plásmidos o transposones que median genes de resistencia para antibióticos no β-lactámicos o metales pesados. Por ejemplo, el transposón ψTn554 codifica la resistencia a cadmio, el plásmido pUB110 codifica la resistencia a tobramicina/bleomicina y el pT181 codifica la resistencia a tetraciclina (Ver fig. 7).<sup>4,9,53,68</sup>

Los elementos SCC*mec* se clasifican en tipos I, II, III, IV, y V, en base a los polimorfismos genéticos en los complejo gen *mec* y en el tipo de complejo *ccr* que ellos poseen y son clasificados en subtipos de acuerdo a las diferencias en su región J del DNA. Como dato, hay cuatro clases genéticas del complejo *mec* (A, B, C y D) y cuatro alotipos del complejo *ccr* (1, 2, 3, y 5) (Ver cuadro I y fig. 8).<sup>4,9,53,68</sup>

En *S. aureus* sólo se han encontrado las clases A, B y C. La C también se encuentra en *S. haemolyticus* y la D en *S. hominis*.<sup>4</sup>

SCC*mec* se le conoce también como una isla de resistencia a los antibióticos. Los elementos SCC*mec* difieren uno de otro en su repertorio de determinantes de resistencia a los antibióticos.<sup>4</sup> Las cepas HA-MRSA contienen el SCC*mec* tipo I, II y III; siendo el tipo II el más prevalente en EUA.<sup>9</sup> El tipo I, que se diseminó entre las cepas MRSA aisladas en los años 60, contiene el gen *mecA* como la única determinante de resistencia, mientras que el tipo II y III contienen múltiples determinantes de resistencia a antibióticos no β-lactámicos y son responsables de el fenotipo de multirresistencia comúnmente encontrado en aislamientos MRSA nosocomiales, permitiéndoles a ellos tener éxito a una presión selectiva pesada.<sup>4,9,67</sup>

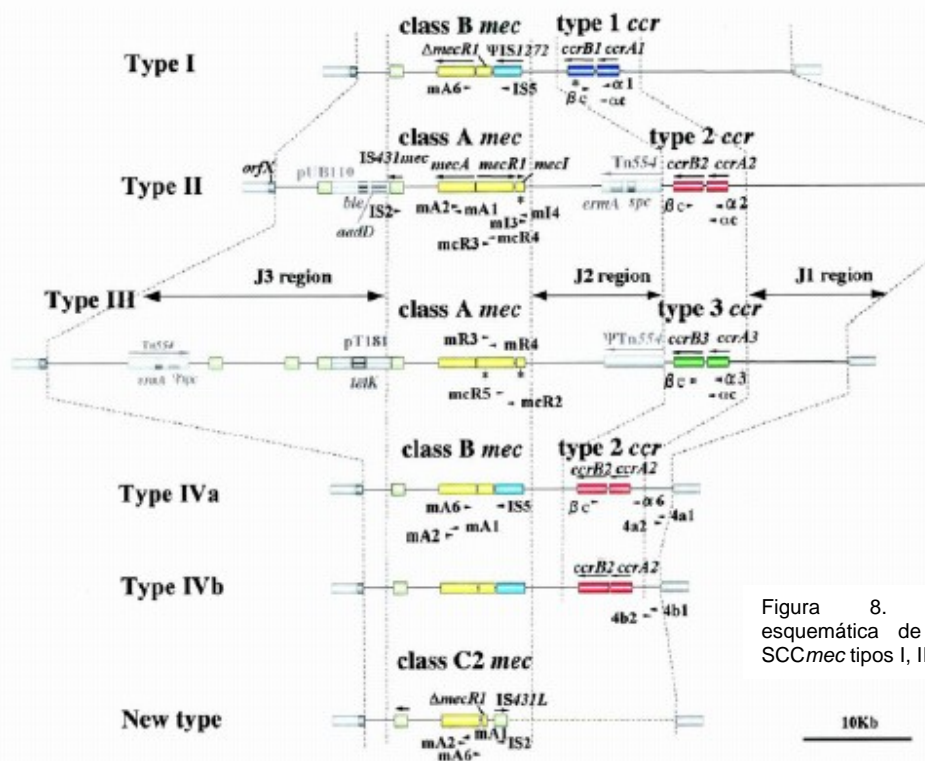


Figura 8. Representación esquemática de los elementos SCC*mec* tipos I, II, III y IVa.

Cuadro I. Tipos de SCC <i>mec</i> y subtipos del tipo IV.				
Tipo SCC <i>mec</i>	Peso molecular kb	Complejo <i>mec</i>	Tipo y complejo <i>ccr</i>	Lugar y año de aislamiento
I	34	Clase B: IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS1272	Tipo 1: <i>ccrB1-ccrA1</i>	Reino Unido, 1961 en cepas MRSA
II	52	Clase A: IS431- <i>mecA-mecR1-mecI</i>	Tipo 2: <i>ccrB2-ccrA2</i>	Japón, 1982 en cepas MRSA
III	66	Clase A	Tipo 3: <i>ccrB3-ccrA3</i>	Nueva Zelanda, 1985 en cepas MRSA
IV Subtipo: IVa IVb IVc IVd	20-24	Clase B Clase B Clase B Clase B	Tipo 2 Tipo 2 Tipo 2 Tipo 2	EUA, 2002 en una clona pediátrica y en cepa CA-MRSA
V	28	Clase C: IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecRI</i> -IS431	Tipo 5: <i>ccrC</i>	Australia, 2004 en cepa CA-MRSA

Los subtipos de SCC*mec* IV difieren en base a la región J del DNA.  
 $\Delta$ : deleción en el extremo 3' del gen.  
 Las clases B y C no presentan el gen *mecI*.

Los elementos genéticos SCC*mec* tipo IV y V se han encontrado en la mayoría de las cepas CA-MRSA y contienen el gen *mecA* con o sin genes adicionales de resistencia a otros antibióticos explicando de tal modo sólo la tendencia hacia la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en estas cepas. Sin embargo, cepas resistentes a eritromicina y fluoroquinolonas ya han sido reportadas en Estados Unidos en el 2005.<sup>9,10,38,48,68</sup> Por lo que se piensa que el origen de esta cepas no lo constituye la diseminación desde el hospital hacia la comunidad, sino que este nuevo agente

---

---

nace de la asociación de dos genotipos: el genotipo resistente de un *Staphylococcus epidermidis* y el genotipo de un *Staphylococcus aureus* meticilina sensible más virulento,<sup>4</sup> lo cuál se sustenta notablemente en el hecho de que secuencias dentro de la región “upstream” de los genes *ccr* de el elemento *SCCmec* tipo IV fueron encontrados frecuentemente en aislamientos de *S. epidermidis* en los 1970, y por que raramente se ha descrito en aislamientos de *S. aureus* antes de 1990, sugiriendo un extenso intercambio horizontal entre especies de estafilococos.<sup>67</sup>

Los casetes cromosomales *SCCmec* tipo IV y V, poseen un tamaño pequeño y contienen elementos genéticos móviles.<sup>4</sup> Los elementos *SCCmec* tipo IV y V son más fácilmente transferidos a otras cepas de *S. aureus* que los elementos más largos *SCCmec* (tipos I, II, y III).<sup>68</sup> Esto puede traer como consecuencia que se muevan rápidamente entre los diversos ambientes genéticos de las cepas de *S. aureus* sensibles a la meticilina que circulan en la comunidad, aumentando la probabilidad de tener nuevas cepas CA-MRSA.<sup>4</sup> En un estudio realizado por Hiramatsu *et al.*,<sup>22</sup> y asociados han especulado que la detección simultánea del elemento *SCCmec* tipo IV en diferentes regiones geográficas del mundo potencialmente refleja su mejorada movilidad y múltiples transmisiones simultáneas de otros estafilococos coagulasa negativos.

Estudios recientes indican que los tipos II y IV se encuentran circulando en cepas MRSA en México.<sup>61,62</sup>

### **1.6.2. Resistencia a oxacilina (gen *mecA*)**

La resistencia a la meticilina se determina utilizando el antibiótico oxacilina, por lo que se ha sugerido que estas cepas deberían llamarse *S. aureus* resistentes a oxacilina (“oxacillin-resistant *S. aureus*”, ORSA), más que MRSA.<sup>4</sup>

Como se hizo notar anteriormente, el gen *mecA* se encuentra en el elemento genético móvil *SCCmec*. El gen *mecA* es el responsable para la síntesis de la “proteína fijadora de penicilina0” 2a (PBP2a; también llamada PBP2’), una

---

---

proteína alterada de 78-kDa. Las PBP2a reemplazan a las otras PBPs, porque presentan baja afinidad para todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y permiten al estafilococo sobrevivir a altas concentraciones de esos agentes. Así, la resistencia a meticilina confiere resistencia a todos los agentes  $\beta$ -lactámicos que se han desarrollado, incluyendo las isoxazoil penicilinas (por ejemplo, la oxacilina) y las cefalosporinas. La proteína PBP2a difiere de las otras PBPs debido a que su sitio activo bloquea la unión de todos los  $\beta$ -lactámicos pero continúa sintetizando peptidoglicano para la pared celular aun cuando las PBP normales estén inhibidas por los antibióticos.<sup>4,35</sup>

El mecanismo por el cuál el gen *mecA*, codifica para la síntesis de la PBP2a, es el siguiente:

En base a la clase original, clase A, esta contiene dos genes intactos *mecI* y *mecR1*, así como el gen *mecA*. El gen *mecI* codifica una proteína represora de la transcripción: MecI. El gen *mecR1* codifica una proteína de transducción de señal: MecR1. Las proteínas MecI y MecR1 regulan la transcripción inducible de *mecA* de la siguiente manera: MecR1 registra la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos con su dominio extracelular de unión a la penicilina y activa su dominio

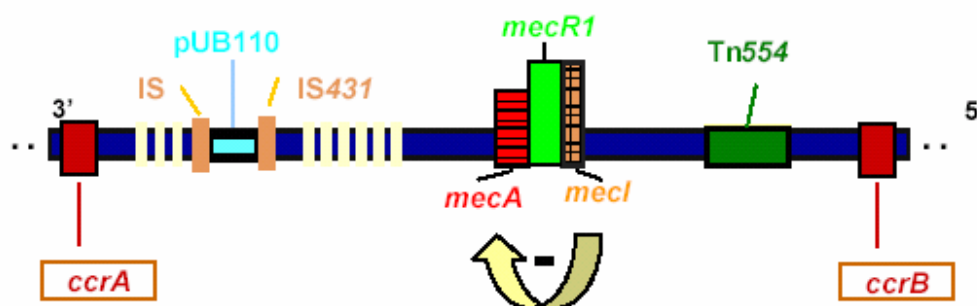


Figura 7. Representación de un fragmento de DNA cromosómico de MRSA con los siguientes elementos: región reguladora del gen *mecA* compuesta por los genes *mecI* y *mecR1*, plásmidos (pUB110), secuencias de inserción (IS431), transposones (Tn554) y genes cromosómicos de las recombinasasas (*ccrA* y *ccrB*). Mecanismo de resistencia de *S. aureus* a la meticilina. La exposición de *mecR1* a antibióticos  $\beta$ -lactámicos induce la síntesis de MecR1, el cuál inactiva a MecI, permitiendo la síntesis de PBP2a.

citoplásmico en forma de proteasa, por rompimiento autocatalítico. Esta proteasa rompe la proteína represora MecI que se encuentra unida al sitio operador del gen

---

---

*mecA*, liberando la represión de la transcripción, por lo que se lleva a cabo la expresión del gen *mecA* produciéndose la proteína PBP2a (fig. 7).<sup>4</sup>

### 1.6.3. Resistencia a macrólidos y lincosamidas

La presencia de varios genes que codifican la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas, han proporcionado las bases para el uso de la susceptibilidad a clindamicina como un marcador para las cepas CA-MRSA. El transposon 554 (Tn554) encontrado en elementos *SCCmec* tipo II, contiene el gen *erm* el cuál confiere resistencia a eritromicina mediante la metilación del RNA ribosómico 23S, que impide la unión del antibiótico y, por tanto, su acción.<sup>6,45</sup>

Los aislamientos de *S. aureus* macrólido-resistente pueden tener resistencia constitutiva o inducible a lincosamidas tales como la clindamicina, por lo que la metilación también puede ser constitutiva o inducible. En la constitutiva, se produce continuamente la metilación del ribosoma, por lo que la bacteria se muestra resistente a todos los macrólidos y lincosamidas. Cuando una bacteria con una metilasa no constitutiva se enfrenta a un macrólido o lincosamida no inductor, es sensible, pero bajo la influencia de un macrólido inductor, se activa la metilación y se vuelve resistente. La eritromicina es un inductor efectivo, pero la clindamicina es un débil inductor. Los aislamientos que contienen el gen *erm* expresan por lo tanto el fenotipo de resistencia llamado *MLS<sub>B</sub>*. Tanto en el fenotipo de resistencia constitutivo *cMLS<sub>B</sub>* (eritromicina y clindamicina resistentes) como el inducible *iMLS<sub>B</sub>* (eritromicina resistente y clindamicina sensible con antagonismo), se consideran resistentes a todos los macrólidos, clindamicina y estreptogramina B. Así, cepas HA-MRSA que contienen el elemento *SCCmec* tipo II, son típicamente resistentes a  $\beta$ -lactámicos así como también a eritromicina y clindamicina (y estreptogramina B).<sup>9,43,45,54</sup>

Los elementos *SCCmec* tipo IV y V, encontrados en la mayoría de las cepas CA-MRSA, no contienen el Tn554 o *erm* y, así, muchos son susceptibles a eritromicina y clindamicina. Sin embargo, *erm* puede estar presente en un plásmido o en otra parte del genoma. También, la resistencia a macrólidos puede

---

---

ocurrir por eflujo, típicamente mediado por el gen *msrA*. Es posible que *msrA*<sup>18</sup> u otros genes que confieren la resistencia a los macrólidos, puedan estar presentes en una cepa CA-MRSA. *msrA* codifica una bomba de flujo específica para los antimicrobianos macrólidos. Cuando la resistencia a eritromicina esta mediada por *msrA*, la resistencia inducible para clindamicina no ocurre (fenotipo M, eritromicina resistente y clindamicina sensible sin antagonismo).<sup>9,45,54</sup>

El funcionamiento de la prueba “D-test” o prueba de doble disco eritromicina-clindamicina, es necesaria para determinar resistencia constitutiva o inducible a lincosamidas como la clindamicina.

### **1.7. Distribución clonal de las cepas MRSA**

En la actualidad la tipificación molecular ha aportado nuevos datos que han dado origen a la epidemiología molecular. En el caso de *S. aureus* en años recientes, después de analizar una gran colección de cepas MRSA que circulan en diferentes áreas geográficas del mundo y de diferentes periodos, se encontró que en contraste a las diferentes cepas numerosas MSSA que causan infecciones, mundialmente, solo un número limitado de clonas MRSA cuentan con la capacidad de diseminación global.<sup>4,35,61</sup> Estas se conocen como clonas MRSA pandémicas. Se han identificado cinco clonas pandémicas: Ibérica, Brasileña, Húngara, Nueva York/Japón y Pediátrica.<sup>4,61</sup>

La clona Ibérica se describió primeramente en España en 1989 y posteriormente se reportó en Portugal, Italia, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Suiza, Francia, Polonia, República Checa y EUA.<sup>4,61</sup>

La clona Húngara se encontró por primera vez en Hospitales de Hungría en 1998 y después se localizó en Tailandia, Taiwán y China.<sup>4,61</sup>

La clona Nueva York/Japón se determinó como una clona dominante en hospitales de Nueva York en 1998 y posteriormente se encontró en Japón.<sup>4,61</sup>



---

---

La clona Pediátrica se identificó en 1992 en un hospital pediátrico de Portugal y después se ha localizado en Polonia, EUA, Argentina, Colombia y Brasil.<sup>4,61</sup>

La clona Brasileña descrita en un principio en Brasil en 1995, se ha diseminado en Portugal, Argentina, Uruguay, Chile y República Checa.<sup>4,61</sup>

La determinación de las clonas MRSA en América Latina es reciente. En el año 2001 se publicaron los primeros trabajos moleculares para la determinación de las clonas del MRSA y se encontró que la clona Brasileña es la que predomina y persiste en Brasil (97%), Argentina (86%), Uruguay (100%) y Chile (56%). En este mismo estudio se observó la presencia de la clona M, presente solamente en los aislamientos de México; la clona de Brasil, predominante en Argentina, Chile y Uruguay, no se identificó en nuestro país.<sup>4,61</sup>

La distinción entre estas clonas refleja los contrastes genéticos de transferencia horizontal del elemento *mec* de especies de estafilococos relacionadas en *S. aureus*.<sup>4,35</sup> La transferencia horizontal es posible gracias a los genes *ccr*,<sup>4</sup> sin embargo, la frecuencia de este evento de transferencia está sujeta a debate. El elemento *SCCmec* que lleva el gen *mecA* ha sido identificado en varios MSSA con diferentes antecedentes genéticos. Comparando los antecedentes genéticos de clonas epidémicas MSSA, investigadores han identificado que probablemente MSSA ancestrales son recipientes del elemento *mec*. Estos estudios sugieren que la emergencia de clonas “epidémicas” MRSA fueron en parte el resultado de la acertada transferencia horizontal del gen *mec* en un ajuste ecológico y eficiente transmisión de la clona MSSA.<sup>35</sup>

Puesto que no existen homólogos de *mecA* en estafilococos meticilino susceptibles, se ha asumido que *mecA* fue adquirido de una o varias especies de estafilococos coagulasa negativos. Couto *et al.*,<sup>8</sup> identificó un gen *mecA* en un *Staphylococcus sciuri* meticilino-sensible con 88% de homología en el nivel de aminoácidos para MRSA. La transducción del *mecA* de *S. sciuri* en un MSSA resultó en una resistencia incrementada a meticilina acoplada con la detección de

---

---

PBP2a. Estos estudios por lo tanto sugieren una posible fuente del elemento *mecA* en *S. aureus*.<sup>35</sup>

### **1.8. Patogénesis e infecciones clínicas**

La patogénesis propuesta para un número de infecciones endógenas causadas por *S. aureus* son de la siguiente manera; frecuentemente neonatos, niños y adultos pueden ser colonizados por *S. aureus* y portar el microorganismo generalmente en fosas nasales y, en ocasiones, en la piel y la ropa, causando una subsecuente infección en sitios de piel dañados, en pacientes con hemodiálisis y en pacientes con catéteres intravasculares. En pacientes quirúrgicos, otras posibilidades son consideradas. Primero, muchos pacientes son intubados antes de la cirugía, traumatizando el epitelio que recubre la faringe, lo cual puede causar un brote hematógeno de *S. aureus* al sitio quirúrgico. Sin embargo, muchos procedimientos quirúrgicos incluyen el uso de profilaxis antimicrobiana, lo cual puede proteger contra esta ruta de infección. No obstante, desinfecciones pre-operativas pueden no ser efectivas en las capas más profundas de la piel, y *S. aureus* puede así convertirse en una fuente de infección durante la cirugía. Otra posibilidad es que *S. aureus* es diseminado de la nariz al aire de la sala de operación y entonces contaminar el sitio quirúrgico durante la cirugía.<sup>36,61</sup> *S. aureus* es por lo tanto un patógeno oportunista que puede acceder al tejido provocando una lesión local o enfermedades de amplio espectro.<sup>61</sup>

*S. aureus* es un comensal y un patógeno extremadamente versátil en humanos, que causa tres síndromes básicos:<sup>24</sup>

#### *(i) Infecciones cutáneas*

Las *infecciones estafilocócicas piogénicas* localizadas incluyen el impétigo, la foliculitis, los forúnculos y el carbunco.<sup>31,41</sup>

El *impétigo*, es una infección superficial que afecta fundamentalmente a los niños pequeños y ocurre fundamentalmente en la cara y en las extremidades. La

---

---

*foliculitis* es una infección piógena de los folículos pilosos. Cuando ocurre en la base de los párpados se conoce como orzuelo. Los *forúnculos* (diviesos), son una extensión de la foliculitis. Son nódulos elevados, dolorosos y grandes con una colección de tejido necrótico debajo. El *carbunco* aparece cuando los forúnculos coalescen y se extienden hasta el tejido subcutáneo más profundo.<sup>41</sup>

Las *infecciones estafilocócicas de las heridas* pueden ocurrir en los pacientes después de una intervención quirúrgica o de un traumatismo, al introducirse en la herida los microorganismos que colonizan la piel. Los estafilococos no son capaces generalmente de producir una infección en un individuo inmunocompetente a no ser que haya un cuerpo extraño en la herida (p. ej., grapas, astillas, suciedad).<sup>41</sup> Las heridas quirúrgicas infectadas, pueden funcionar como focos para el desarrollo de infecciones sistémicas.<sup>31</sup>

(ii) *Infecciones profundas y sistémicas*

*S. aureus* es una causa frecuente de *bacteriemia*. No se conocen los focos iniciales de la infección en aproximadamente un tercio de los pacientes con bacteriemias por *S. aureus*. Lo más probable es que la infección se extienda al torrente sanguíneo a partir de una infección cutánea de aspecto inocuo. Más del 50% de las bacteriemias por *S. aureus* se adquieren en el hospital después de una intervención quirúrgica, o como resultado del uso continuo de un catéter intravascular que está contaminado. Las bacteriemias por *S. aureus*, fundamentalmente los episodios prolongados, se asocian con la diseminación a otras partes del organismo y dar origen a una endocarditis, una osteomielitis, una pioartritis y la formación de abscesos metastáticos, particularmente en la piel, los tejidos subcutáneos, los pulmones, el hígado, los riñones y el cerebro.<sup>31,41</sup>

La *endocarditis* aguda producida por *S. aureus* es una enfermedad grave, con una tasa de mortalidad de aproximadamente el 50%. A no ser que se instituya un tratamiento médico y quirúrgico adecuado de forma inmediata, el pronóstico del paciente es malo. La curación clínica de la endocarditis es la regla, aunque es

---

---

frecuente que existan complicaciones como consecuencia de la diseminación secundaria de la infección a otros órganos.<sup>41</sup>

La enfermedad respiratoria por *S. aureus* se puede producir después de la aspiración de secreciones orales o de la diseminación hematológica del microorganismo desde un foco alejado. La *neumonía por aspiración* se observa fundamentalmente en los jóvenes, ancianos, pacientes con fibrosis quística, gripe, enfermedad pulmonar obstructiva crónica con intubación y aspiración y bronquiectasias.<sup>31,41</sup> La *neumonía de diseminación hematológica* es frecuente en pacientes con bacteriemia o endocarditis.<sup>41</sup> Las enfermedades malignas subyacentes se conocen como factores de riesgo para el desarrollo de una bacteriemia por *S. aureus*. La *bronconeumonía estafilocócica* adquirida en la comunidad se observa habitualmente en ancianos y se asocia con una neumonía viral como factor predisponente.<sup>31</sup>

La *osteomielitis* por *S. aureus* puede resultar de la diseminación hematológica en el hueso tanto en niños como en adultos, o puede ser una infección secundaria como consecuencia de un traumatismo, una infección quirúrgica o de la extensión de una infección desde una zona adyacente. *S. aureus* es la principal causa de *artritis séptica* en los niños pequeños y en los adultos que reciben inyecciones intraarticulares o que tienen articulaciones con anomalías mecánicas. La afectación secundaria de múltiples articulaciones indica la diseminación hematológica desde un foco localizado. La infección se demuestra generalmente en las grandes articulaciones (p. ej., hombro, rodilla, cadera y codo). El pronóstico en los niños es excelente, pero los adultos depende de la naturaleza de la enfermedad subyacente, así como la aparición de complicaciones infecciosas secundarias.<sup>41</sup>

La *meningitis estafilocócica* aparece en pacientes con anormalidades del sistema nervioso central relacionados con traumatismos, cirugía, tumores malignos e hidrocefalia y *S. aureus* es una de las causas más frecuentes de meningitis asociada con derivaciones ventriculoperitoneales. *S. aureus*, también es uno de

---

---

los muchos microorganismos asociados con peritonitis en pacientes sometidos a *diálisis peritoneal ambulatoria continua*,<sup>31</sup> además es causante de infecciones del tracto urinario.<sup>4</sup>

(iii) *Síndromes toxémicos*

El *síndrome de choque tóxico* (“toxic shock síndrome”, TSS) y *fiebre escarlata estafilocócica* se deben ambos a la toxina 1 de síndrome de choque tóxico (“toxic shock síndrome toxin 1”, TSST-1) y enterotoxinas estafilocócicas (“staphylococcal enterotoxins”, SEs).<sup>4,24</sup>

La TSST-1 fue la primer toxina identificada como un marcador para el TSS.<sup>11</sup> El síndrome de choque tóxico fue descrito por primera vez en 1978.<sup>31</sup> El síndrome de choque tóxico puede ser menstrual (por coincidir con el período menstrual) y está asociado con el uso de tampones, o bien ser no menstrual en cuyo caso como la celulitis, bursitis, infecciones posparto, infecciones vaginales o como una complicación de los abscesos estafilocócicos, la osteomielitis, las infecciones de las heridas quirúrgicas y la neumonía posinfluenzae.<sup>4,31</sup>

El síndrome de choque tóxico es una enfermedad multisistémica que se inicia con el crecimiento localizado de las cepas de *S. aureus* productoras de la toxina en la vagina o en la herida, seguido de la liberación de la toxina al torrente circulatorio. Las manifestaciones clínicas comienzan de forma brusca y consisten en fiebre alta, hipotensión, un exantema eritematoso difuso, descamación de la piel después de 1 a 2 semanas del ataque (si no es fatal antes de este tiempo), e implicación de tres o más sistemas (gastrointestinal, muscular, renal, hepático, hematológico y nervioso central).<sup>4,11,31,41</sup> En adultos puede producir síndrome de dificultad respiratoria, coagulación intravascular y falla renal.<sup>4,31</sup> La muerte en los pacientes con TSS se produce por un choque hipovolémico que lleva a un fallo multiorgánico.<sup>41</sup> La alta tasa inicial de fallecimientos ha disminuido aproximadamente el 5% al conocerse mejor la epidemiología y la etiología de esta enfermedad.<sup>11,41</sup> Sin embargo, a no ser que el paciente se trate específicamente con un antibiótico eficaz, el índice de recidiva es tan alto como del 65%.<sup>41</sup>

---

---

El *síndrome de piel escaldada estafilocócica* (“staphylococcal scalded-skin syndrome”, SSSS) es debido a exfoliatinas producidas por *S. aureus*. La enfermedad se caracteriza por el inicio brusco de un eritema perioral localizado (enrojecimiento e inflamación alrededor de la boca) que se extiende por todo el cuerpo en los dos días siguientes y poco después se forman grandes ampollas y vesículas cutáneas que se siguen de la descamación del epitelio. El epitelio vuelve a estar intacto en 7 a 10 días, cuando aparecen los anticuerpos protectores. Aunque es una enfermedad fundamental de neonatos y de niños, la tasa de mortalidad es baja. Cuando ocurre la muerte, es el resultado de una infección bacteriana secundaria de las zonas de piel afectadas.<sup>41</sup> El *impétigo ampolloso* es una forma localizada de SSSS. Las cepas específicas de *S. aureus* productoras de toxina se asocian con la formación de ampollas cutáneas superficiales. El eritema no se extiende más allá de los límites de la ampolla. La enfermedad sucede fundamentalmente en lactantes y en niños pequeños y es fácilmente transmisible.<sup>41</sup>

La colonización de *S. aureus* de alimentos ha sido a lo largo asociado con una forma de gastroenteritis que es manifestado clínicamente como emesis con o sin diarrea. Esta condición es llamada *intoxicación estafilocócica por alimentos* (“staphylococcal food poisoning”, SFP) y resulta de la ingestión de una o más SEs preformadas en alimentos que han sido contaminados con *S. aureus*. La ingestión de SEs no resulta en medida enterotoxémico al menos que altas dosis sean consumidas extremadamente.<sup>11</sup> Los estafilococos ingeridos después del tiempo de incubación, no producen más toxina, por lo que la enfermedad típicamente se resuelve dentro de las 25 a 48 h del ataque y sólo requieren tratamiento de sostén.<sup>11,41</sup> Ciertas cepas de *S. aureus* pueden producir también enterocolitis y ocurre fundamentalmente en los pacientes que han recibido antibióticos de amplio espectro, que suprimen la flora normal del colon y permiten el crecimiento de *S. aureus*.<sup>41</sup>

---

---

## 1.9. Factores de virulencia

El éxito de la colonización y la producción de enfermedades por *S. aureus* se debe a la expresión de factores de virulencia que participan en adhesión, adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune del hospedero. En base a esto, los factores de virulencia se clasifican en tres categorías: (a) factores involucrados en la adherencia de la célula hospedera o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina, colágeno y coagulasa; (b) factores involucrados en la evasión de las defensas del hospedero, como las enterotoxinas estafilocócicas, la TSST-1, la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares; (c) factores involucrados en la invasión de la célula hospedera y penetración de los tejidos, como la toxina  $\alpha$  y hemolisinas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . En el cuadro II se muestra una clasificación de los factores de virulencia de *S. aureus* teniendo en cuenta si forman parte estructural de la bacteria o si son enzimas o toxinas.<sup>4,61</sup>

Cuadro II. Principales factores de virulencia de <i>S. aureus</i> .		
Estructurales	Enzimas	Toxinas
Pared celular (Peptidoglicano)	Catalasa	$\alpha$ (Hemolisina $\alpha$ )
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina $\beta$
Factores de adhesión	Lipasas	Hemolisina $\gamma$
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Hemolisina $\delta$
Polisacáridos capsulares	Nucleasas	Leucocidina Pantón-Valentine (PVL)
	Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas
	Estafilocinasa	TSST-1
	Colagenasa	Toxinas exfoliativas (ET-A y ET-B)

Factores de virulencia de *S. aureus*:

### 1.9.1. Estructura de la pared celular

La estructura de la pared celular estafilocócica se ilustra en la fig. 9:

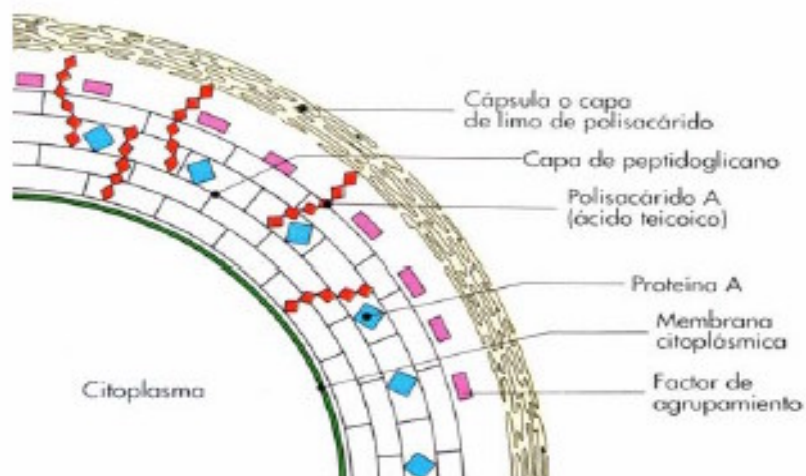


Figura 9. Estructura de la pared celular del estafilococo.

De acuerdo con la inmunotipificación del *polisacárido capsular* en los aislamientos clínicos de *S. aureus*, se han identificado once serotipos capsulares, con la mayor parte de las infecciones asociadas a los serotipos 1, 5 y 8.<sup>31,41,61</sup> El tipo 8, también está asociado con otros factores de virulencia de *S. aureus*, como por ejemplo, la producción de la toxina del síndrome de choque tóxico. Además, una gran cantidad de cepas de *S. aureus* que son resistentes a la oxacilina, expresan el serotipo 5 de polisacárido capsular.<sup>31</sup>

La cápsula lo protege al inhibir la quimiotaxis y la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, a la vez que inhibe la proliferación de las células mononucleares después de la exposición al mitógeno. También facilita que se unan a los catéteres y a otros materiales sintéticos (p. ej., injertos, anastomosis o *shunts*, válvulas y articulaciones protésicas).<sup>41</sup>

El *peptidoglicano* suministra el exoesqueleto rígido de la pared celular.<sup>3</sup> El peptidoglicano está formado por capas de cadenas de glicanos construidas con 10 o 12 subunidades alternantes de ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina. Las cadenas de tetrapéptidos laterales de *S. aureus* están unidas a las subunidades de ácido *N*-acetilmurámico y tienen enlaces cruzados con puentes de



---

---

pentaglicina que están unidos a la L-lisina en una cadena tetrapeptídica y a la D-alanina en la cadena adyacente.<sup>41</sup>

El peptidoglicano tiene una actividad de tipo endotoxina, estimulando la producción de pirógenos endógenos, la activación del complemento y la formación de interleucina-1 por parte de los monocitos, y la agregación de los leucocitos polimorfonucleares (un proceso responsable de la formación de abscesos).<sup>3,41</sup>

Los *ácidos teicoicos* son polímeros de glicerol o fosfato ribitol unidos de manera covalente a la capa de peptidoglicanos o a través de una unión lipofílica a la membrana citoplasmática (ácidos lipoteicoicos). El ácido teicoico de ribitol, con residuos de *N*-acetilglucosamina (polisacárido A) se encuentra presente en *S. aureus*.<sup>3,41</sup>

Los ácidos teicoicos median la adhesión del *S. aureus* a la superficie mucosa a través de sus uniones específicas a la fibronectina. Aunque los ácidos teicoicos son pocos inmunogénicos, estimulan una respuesta de anticuerpos específicos cuando se encuentran unidos a los peptidoglicanos. La medición de esta respuesta de anticuerpos se ha utilizado para detectar la enfermedad estafilocócica sistémica, aunque es menos sensible que otras pruebas diagnósticas.<sup>41</sup>

La superficie de la mayoría de las cepas de *S. aureus* está cubierta de forma uniforme con la *proteína A*. Esta proteína se une de forma covalente a la capa de peptidoglicanos y tiene una afinidad especial para unirse al receptor Fc de las inmunoglobulinas IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> por lo que previenen eficazmente la eliminación inmune mediada por anticuerpos del microorganismo. La proteína A extracelular se puede unir también a los anticuerpos, formando inmunocomplejos con el consiguiente consumo de complemento.<sup>41</sup> Por lo tanto la proteína A funciona como un factor de virulencia al interferir en la opsonización y la ingestión de los microorganismos por parte de los leucocitos polimorfonucleares, activar al complemento y estimular reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato y retardado. La proteína A es inmunogénica y en los individuos con infecciones graves producidas por *S. aureus* se encuentran anticuerpos dirigidos contra ella.<sup>31</sup>

---

---

La presencia de la proteína A en *S. aureus* constituye la base de las pruebas de coagulación que se utilizan en muchos laboratorios clínicos para la identificación de microorganismos (p. ej., gonococos, determinación de grupo de estreptococos) y para la detección de antígenos bacterianos en líquidos corporales.<sup>31</sup>

La *membrana citoplasmática* está formada por un complejo de proteínas, lípidos y una pequeña cantidad de hidratos de carbono. Sirve de barrera osmótica para la célula y proporciona una sujeción para la biosíntesis celular y las enzimas respiratorias.<sup>41</sup>

### **1.9.2. Enzimas estafilocócicas**

La *coagulasa* producida por *S. aureus* existe en dos formas, una unida (llamada también factor de agregación) y una libre. La *coagulasa unida* a la pared celular del estafilococo se une a la protrombina, este complejo transforma el fibrinógeno en fibrina insoluble y esto provoca la agregación de los estafilococos. La *coagulasa libre* reacciona con el factor reactivo de la coagulasa (CFR, una globulina), presente en el plasma, dando lugar a un complejo análogo a la trombina (estafilotrombina) que reacciona con el fibrinógeno formando el coagulo de fibrina. La coagulasa se utiliza como marcador de virulencia y permite diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies estafilocócicas (coagulasa negativas).<sup>4,41</sup>

La importancia de la coagulasa en la patogenia de la enfermedad radica en que esta enzima causa la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, de modo que la infección quede localizada y se proteja a las bacterias de la fagocitosis.<sup>4,41</sup>

El *factor de agrupamiento* o *factor clumping* es un compuesto superficial de *S. aureus* al cual se debe la adherencia de los organismos al fibrinógeno y fibrina. Cuando se mezcla con el plasma, *S. aureus* forma grupos. El factor de agrupamiento es distinto de la coagulasa.<sup>3</sup>

---

---

La *catalasa* no es considerada un factor de virulencia, pero la prueba de la catalasa es usada para distinguir estafilococos de estreptococos, los cuales no produce la catalasa.<sup>36</sup> La catalasa cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno tóxico en agua y oxígeno ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  [burbujas de gas]). El peróxido de hidrógeno se puede acumular durante el metabolismo bacteriano o después de la fagocitosis.<sup>41</sup> Si se permite que se acumule, resulta letal para las bacterias.<sup>31</sup>

La *fibrinolisisina*, conocida también como *estafilocinasa*, es producida prácticamente por todas las cepas de *S. aureus*, y puede disolver coágulos de fibrina, permitiendo la diseminación de la infección a los tejidos contiguos.<sup>31,41</sup> La estafilocinasa es diferente de las enzimas fibrinolíticas producidas por los estreptococos, actuando de manera mucho más lenta en comparación con la estreptocinasa.<sup>3,41</sup>

La *hialuronidasa* hidroliza los ácidos hialurónicos y los mucopolisacáridos ácidos que se encuentran en la matriz intercelular del tejido conectivo y, por lo tanto, la enzima favorece la diseminación de *S. aureus* a zonas adyacentes. Más del 90% de las cepas de *S. aureus* producen esta enzima.<sup>31,41</sup>

Todas las cepas de *S. aureus* producen diferentes *lipasas*. Estas enzimas hidrolizan los lípidos, una función esencial para asegurar la supervivencia de los estafilococos en las zonas sebáceas del organismo. Se cree que estas enzimas deben estar presentes para que los estafilococos puedan invadir los tejidos cutáneos y subcutáneos, y para que se puedan desarrollar las infecciones cutáneas superficiales (p. ej., forúnculos).<sup>41</sup> Se ha descrito una fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol asociada con cepas recuperadas de pacientes con síndrome de distrés respiratorio del adulto y coagulación intravascular diseminada. Los tejidos afectados por esta enzima se vuelven más susceptibles al daño y la destrucción por componentes bioactivos y productos de la activación del complemento.<sup>31</sup>

La *nucleasa* termoestable es otro marcador de *S. aureus*. El papel de esta enzima en la patogénesis de la infección es desconocida.<sup>41</sup>

---

---

La producción de las *penicilinasas* puede ser inducible (es decir, se producen sólo en presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos) o constitutiva (es decir, se producen continuamente) y hacen que estos microorganismos sean resistentes a la penicilina y la ampicilina.<sup>31</sup>

### **1.9.3. Toxinas estafilocócicas**

La TSST-1 forma parte del grupo de toxinas conocidas como superantígenos toxina pirogénicos (PTSAgs), ya que tienen actividad biológica de pirogenicidad y superantigenicidad.<sup>4</sup> Estas toxinas se unen en los macrófagos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, que interaccionan con la subunidad  $\beta$  de los receptores específicos de las células T, dando lugar a la proliferación inespecífica de las células T y a la liberación de citocinas, prostaglandinas y leucotrienos (los cuáles producen los signos y síntomas del síndrome).<sup>4,41</sup> La TSST-1 suprime la quimiotaxis de neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema reticuloendotelial.<sup>4</sup>

La TSST-1 es capaz de inducir también una hipersensibilidad aumentada a la endotoxina. A bajas concentraciones, TSST-1 produce también una extravasación de las células endoteliales, mientras que a altas concentraciones causa en las células un efecto citotóxico.<sup>41</sup>

La TSST-1, anteriormente conocida como exotoxina pirogénica C y enterotoxina F es una exotoxina de 22.000d termoestable y resistente a la proteólisis, que se encuentra mediada por un cromosoma.<sup>41</sup>

La TSST-1 tiene la capacidad de atravesar las barreras mucosas por lo que es la responsable de los efectos sistémicos del TSS, incluso cuando la infección está localizada en la vagina o en la herida.<sup>11,41</sup>

La *enterotoxinas estafilocócicas* también forman parte del grupo de las PTSAgs. Se conoce una gran variedad de estas toxinas: en secuencia alfabética de SEA a

---

---

SEE, de SEG a SEJ, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO.<sup>4</sup> Estas toxinas son producidas del 30 al 50% por las cepas de *S. aureus*.<sup>41</sup>

Las SEs son una causa importante de intoxicación por alimentos debido a que estas se producen cuando *S. aureus* se desarrolla en alimentos que contienen carbohidratos y proteínas. Cuando se consumen alimentos contaminados con *S. aureus*, las SEs al igual que la TSST-1 son capaces de inducir la activación inespecífica de las células T localizadas a lo largo del intestino, resultando en una respuesta masiva de células T y liberación de citocinas; actúan sobre los receptores nerviosos del intestino produciendo gastroenteritis; estimulan el peristaltismo intestinal y ejercen un efecto sobre el sistema nervioso central, que se manifiesta clínicamente por vómitos con o sin diarrea, los cuales acompañan a la enfermedad gastrointestinal.<sup>3,4,36,41</sup>

Las enterotoxinas A a E son responsables de las características clínicas de la intoxicación alimentaria estafilocócica.<sup>31</sup> La enterotoxina A es la que se asocia con más frecuencia a la enfermedad.<sup>36,41</sup> Las enterotoxinas son estables a 100 °C durante 30 minutos, y son resistentes a las enzimas gástricas y yeyunales. Por eso, una vez que el alimento se ha contaminado por estafilococos productores de enterotoxinas, y que se han producido las toxinas, el hecho de volver a calentar la comida o el proceso de digestión, no inactivan a la toxina.<sup>41</sup>

Otras enterotoxinas estafilocócicas (SEG, SEH, y SEI) o genes (*sej* y *sek*) pueden ser también PTSAGs o codificar PTSAGs porque ellos exhiben actividad superantigénica o homología en la secuencia para ser PTSAGs.<sup>11</sup>

Se han identificado dos formas distintas de *toxina exfoliativa* (ETA y ETB), y ambas puede producir la enfermedad de el síndrome de la piel escaldada estafilocócica. ETA es termoestable y el gen es cromosómico, mientras que ETB es termolábil y mediada por un plásmido.<sup>41</sup>

Estudios ultraestructurales han puesto de manifiesto que la exposición a las toxinas, que son serín proteasas, está seguida por la rotura de los puentes

---

---

intracelulares (desmosomas) en el estrato granuloso de la epidermis. Las toxinas no se asocian con citólisis ni inflamación, por lo que ni los estafilococos ni los leucocitos están presentes en la capa de la epidermis afectada. Después de la exposición de la epidermis a la toxina, se desarrollan anticuerpos neutralizantes protectores, lo que lleva a la resolución del proceso tóxico.<sup>41</sup>

El síndrome de la piel escaldada estafilocócica se ve fundamentalmente en niños, y sólo rara vez en niños mayores o en adultos, posiblemente a que ETA y ETB se unen a los glucolípidos del tipo GM4, que se encuentran en la epidermis de los neonatos susceptibles, pero no en la de los niños mayores o en la de los adultos.<sup>41</sup>

*S. aureus* produce cuatro clases de hemolisinas (alfa, beta, delta y gamma).<sup>11</sup>

La  $\alpha$ -hemolisina es por mucho la citotoxina más examinada cuidadosamente de *S. aureus*. La  $\alpha$ -hemolisina es un polipéptido de 33,000d que producen la mayoría de las cepas de *S. aureus* y es tóxica para un amplio rango de células de mamíferos.<sup>11,41</sup> La  $\alpha$ -hemolisina es particularmente activa contra eritrocitos, y es también dermonecrótica por inoculación subcutánea y es letal para los animales cuando se le inyecta por vía intravenosa. También es una potente neurotoxina.<sup>4,11,31</sup>

La toxina- $\alpha$ , es considerada como el prototipo de las citotoxinas formadoras de poros y es citolítica para un gran número de células, entre las que se encuentran los monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas, células endoteliales y las células de cultivo (p. ej., los fibroblastos diploides humanos, las células HeLa). La  $\alpha$ -hemolisina es secretada por *S. aureus* y se integra en las regiones hidrofóbicas de la membrana de la célula del hospedero, estableciendo héptameros cilíndricos con la formación de poros de 1 a 2 nm, capaces de lisar también las células eucariontes.<sup>4,11,41</sup> El poro resultante permite el rápido flujo de  $K^+$  y otras pequeñas moléculas y la afluencia de  $Na^+$ ,  $Ca^+$  y pequeñas moléculas de bajo peso molecular. La hinchazón osmótica de los eritrocitos finalmente resulta en lisis.<sup>11,41</sup> La sensibilidad varía según la especie animal (los eritrocitos del conejo son 1.000 veces más sensibles que las células humanas) y el tipo de célula (p. ej., los

---

---

fibroblastos pueden reparar el daño en la membrana de una forma más eficaz que los eritrocitos).<sup>41</sup>

La toxina tiene un número de efectos en el hospedero, debido en gran parte a la formación de poros no regulados por la transmisión de iones a través de las membrana de las células. Estos efectos incluyen la activación de endonucleasas, exocitosis de plaquetas y liberación de citocinas y mediadores inflamatorios. La producción de tromboxano y prostaciclina activan los mecanismos de vasoconstricción. En adición, la hinchazón osmótica causa un daño en la integridad celular aumentando la permeabilidad vascular. El efecto final en el hospedero es un edema pulmonar o síndrome de dificultad respiratoria.<sup>4,11</sup> Se cree que la alfa-toxina es un mediador importante del daño tisular en la enfermedad estafilocócica.<sup>41</sup> Finalmente, el flujo de calcio puede liberar nucleasas celulares, conduciendo a la apoptosis o muerte celular.<sup>11</sup>

La  $\beta$ -hemolisina, conocida también como *esfingomielinasa C*, es una proteína termolábil de 35.000d producida por la mayoría de las cepas de *S. aureus*. Esta enzima tiene actividad de fosfolipasa C, la cuál tiene especificidad para la esfingomielina y para la lisofosfatidilcolina, y es tóxica para una variedad de células, entre las que se encuentran los eritrocitos, los leucocitos, los macrófagos y los fibroblastos. Cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana en las células susceptibles, con una lisis proporcional a la concentración de esfingomielina expuesta en la superficie de la célula. Se cree que esto es responsable de las diferencias en la sensibilidad de las especies a la toxina.<sup>4,11,41</sup>

La  $\beta$ -hemolisina, es una hemolisina “caliente-fría” (es decir, sus propiedades hemolíticas se incrementan con la incubación abajo de 10 °C después del tratamiento a 37 °C).<sup>11,31</sup>

Su función durante la enfermedad no está determinada claramente. Sin embargo, el alto nivel de expresión en células de animales indica que la  $\beta$ -hemolisina le produce una ventaja selectiva a la bacteria.<sup>4,11</sup> Se cree que en los humanos es

---

---

responsable junto con la  $\alpha$ -hemolisina, de la destrucción tisular y de la formación de los abscesos característicos de las enfermedades estafilocócicas.<sup>41</sup>

La  $\beta$ -hemolisina, junto con el factor CAMP producido por los estreptococos del grupo B, es responsable de la hemólisis sinérgica observada en las pruebas de CAMP-positivas para la identificación presuntiva de los estreptococos del grupo B.<sup>11,31</sup>

La  $\delta$ -hemolisina tiene un amplio espectro de actividad citolítica, es capaz de lisar eritrocitos y otras células de mamíferos, así como estructuras subcelulares rodeadas de una membrana tales como organelos, esferoplastos y protoplastos. Esta toxicidad de membrana relativamente inespecífica concuerda con lo que se ha propuesto, que la  $\delta$ -hemolisina actúa como un surfactante para romper la membrana celular.<sup>4,11,41</sup>

La  $\delta$ -hemolisina tiene un peso molecular de aproximadamente 3,000d y es producida por 97% de las cepas de *S. aureus*.<sup>4,11,41</sup>

Aunque la  $\delta$ -hemolisina causa una amplia variedad de efectos citotóxicos, su importancia en la enfermedad no es clara y no se sabe si induce la liberación de mediadores de la inflamación.<sup>4,11</sup>

La  $\delta$ -hemolisina también tiene actividad dermonecrótica y puede ser letal en animales de laboratorio a concentraciones elevadas como resultado de la contaminación con muy pequeñas cantidades de la  $\alpha$ -hemolisina.<sup>4,11</sup>

La  $\gamma$ -hemolisina es producida virtualmente en cada cepa de *S. aureus* y afecta a neutrófilos y macrófagos, es capaz de lisar muchas variedades de eritrocitos de mamíferos. Sin embargo, no está claro si la  $\gamma$ -hemolisina puede inducir la desgranulación de leucocitos polimorfonucleares y la liberación de mediadores inflamatorios.<sup>4,11</sup> La  $\gamma$ -hemolisina no es identificable sobre placas de agar sangre debido al efecto inhibitorio del agar sobre la actividad de la toxina.<sup>11</sup>



---

---

Los genes que codifican factores de virulencia como las enterotoxinas A a I, TSST-1, las toxinas exfoliativas A y B, y las proteínas asociadas a la superficie, como la proteína de unión al colágeno, se encuentran localizados en elementos genéticos móviles llamados islas de patogenicidad (SaPIs), los cuales se transfieren horizontalmente entre las cepas.<sup>4</sup> Los genes de algunos factores asociados con la supresión de la inmunidad innata como las proteínas inhibidoras de la quimiotaxis, hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ , y la estafilocinasa se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano.<sup>4,11</sup>

#### **1.9.4. Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL)**

La leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) es una citotoxina que causa necrosis tisular.<sup>33,38</sup> La leucocidina es citotóxica para los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del humano. Es una proteína que tiene la habilidad de inducir secreción de gránulos en leucocitos polimorfonucleares y formar poros en la membrana plasmática de los leucocitos, lo cual provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula. La lisis de los leucocitos produce la liberación de mediadores inflamatorios, con una consecuente respuesta inflamatoria grave.<sup>4,9,11</sup>

La presencia de PVL en *S. aureus* parece estar asociado con el incremento en la severidad de las enfermedades, extendiéndose desde una infección cutánea que requiere drenaje quirúrgico a una osteomielitis y neumonía necrotizante mortal.<sup>38</sup> Las cepas PVL-MRSA están asociadas con infección profunda en piel y tejido blando, neumonía necrotizante, y fascitis necrotizante.<sup>10,47</sup>

PVL, junto con la  $\gamma$ -hemolisina pertenecen a la familia de toxinas sinergiohimenotrópicas. Estas toxinas dañan la membrana de las células de defensa del hospedero y eritrocitos respectivamente, por la acción sinérgica de dos clases no asociadas de proteínas secretadas referidas como S y F (proteínas de elución lenta "slow" y rápida "fast" en una columna de intercambio iónico). Estudios han mostrado que los componentes de estas proteínas se presentan de dos loci distintos dentro del genoma de *S. aureus*. En cepas conteniendo ambas

---

---

citotoxinas, seis clases S (HlgA, HlgC, LukS-PV, LukE, LukM, y LukS1) y cinco leucotoxinas clase F (HlgB, LukF-PV, LukD, LukF'PV, y LukF1) son conocidas. Los dos pares HlgA + HlgB y HlgC + HlgB componen la  $\gamma$ -hemolisina; mientras que todos los aislamientos productores de PVL producen las proteínas específicas de clase S y clase F para PVL (LukS-PV y LukF-PV, respectivamente), codificadas por dos genes *lukS-PV* y *lukF-PV*.<sup>9,11,33,67</sup> El gen PVL puede ser movilizado por el profago  $\emptyset$ SLT.<sup>4</sup> El fragmento *EcoRV* de 6.5 kb del cromosoma de *S. aureus* contiene el locus entero *luk-PV*, que consiste de dos marcos de lectura separados. La proteína LukS-PV es un polipéptido de 312-aminoácidos que incluye una secuencia señal de 28 residuos que es hendida para producir la proteína madura con un peso molecular de 32,000 y un pI de 9.0. La proteína LukF-PV es una proteína de 325-aminoácidos que similarmente contiene un péptido señal de 24 residuos. La proteína madura tiene un pI de 9 y un peso molecular de 34,000.<sup>11</sup>

El mecanismo de acción de la toxina y su papel en la progresión de enfermedades estafilocócicas no es muy claro, sin embargo, en base a estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha visto que la subunidad S es más importante que la subunidad F con respecto a inducir una respuesta de los leucocitos polimorfonucleares, indicando que la respuesta inflamatoria severa puede ser lograda por esta toxina bicompuesta regulada primeramente por la potencia de la subunidad S. Una hipótesis de trabajo es que el componente S es responsable para iniciar la unión a la membrana, haciendo esto más crítico en determinar la actividad de las dos subunidades.<sup>11</sup>

Aunque los genes que codifican para PVL han sido encontrados en menos del 5% de los aislamientos de *S. aureus* a nivel mundial,<sup>4,9,33,38</sup> estos están presentes en más cepas MSSA responsables de furunculosis y neumonía necrotizante.<sup>9</sup> Sin embargo, se han encontrado en un alto grado en cepas CA-MRSA con proporciones de 77% a 100%.<sup>38</sup> Pocas cepas HA-MRSA producen PVL, sin embargo, ahora son reconocidos cada vez más en hospitales.<sup>9,47</sup>

---

---

Estudios indican que PVL esta circulando en múltiples linajes clonales, muchos asociados con MRSA SCC*mec* tipo IV.<sup>10</sup> PVL junto con los elementos SCC*mec* tipo IV o V son comúnmente considerados como marcadores moleculares de CA-MRSA.<sup>9</sup> Su presencia se piensa que las cepas CA-MRSA son consecuencia de uno de estos raros eventos de transferencia horizontal el gen *mec*, indicando que existe la posibilidad de que una cepa pandémica de *S. aureus* de los años 60's evolucionó inicialmente adquiriendo el gen PVL y posteriormente el SCC*mec* IV, dando origen a las actuales clonas CA-MRSA.<sup>4</sup> También se cree que su presencia les confiere una ventaja a estas cepas permitiéndoles sobrevivir y diseminarse.<sup>9</sup>

### **1.10. Sistema quórum-sensing *agr***

Para mejorar la habilidad de causar una variedad de enfermedades y ocupar numeroso nichos dentro del hospedero, *S. aureus* ha desarrollado un sistema *quórum-sensing* o autoinducción que establece una comunicación entre células y regular numerosos factores de colonización y virulencia.<sup>65</sup> El *quórum-sensing* es un fenómeno por el cual las bacterias determinan su propia densidad poblacional a través de una serie de moléculas sensoras a veces denominadas autoinductoras, ya que pueden incluso estimular a la propia célula que las liberó. La concentración de estas moléculas señales se incrementa conforme aumenta la población hasta que alcanza un determinado nivel, indicando a las bacterias que la población ha alcanzado un nivel crítico o *quórum*. Entonces, las bacterias comienzan a expresar una serie de genes dependientes del quórum.<sup>46</sup>

El sistema *quórum-sensing* accesorio gen regulador (“accessory gene regulator”, *agr*), se le ha asignado un papel central en la patogénesis de los estafilococos, particularmente *S. aureus*. El sistema *quórum-sensing agr* disminuye la expresión de varias proteínas de superficie celular y aumenta la expresión de muchos factores de virulencia secretados (toxinas y enzimas) en la transición de la fase exponencial tardía a la fase estacionaria de crecimiento *in vitro*,<sup>18,65</sup> lo cuál significa que las proteínas de superficie celular son producidas durante la fase

---

---

exponencial tardía, mientras que las toxinas secretadas y enzimas son producidas principalmente durante la fase postexponencial de crecimiento.<sup>56</sup>

Dos transcritos primarios, RNA II y RNA III, son generados por el locus *agr* y originarios de los promotores P2 y P3, respectivamente. El operón P2 codifica cuatro proteínas que generan el mecanismo *agr*-sensing. Agr B es una proteína integral de la membrana que parece estar implicada en (a) el procesamiento del producto de *agrD* en un octapéptido; (b) secreción del sensor, péptido autoinductor (“autoinducing peptide”, AIP); (c) modificación del AIP por la formación de una tiolactona cíclica enlazada entre una cisteína interna y el carboxilo terminal. El resultado, es un AIP maduro que se acumula en el ambiente extracelular durante el crecimiento bacteriano, alcanza una concentración umbral (quórum-sensing) y activa por fosforilación un sistema regulador de dos componentes AgrA y AgrC, en el cual el componente transmembranal, AgrC (receptor-histidina cinasa), se une al AIP extracelular y en turno modula la actividad de AgrA, el regulador citoplasmático de la respuesta.<sup>18,65</sup> A través de un mecanismo todavía indefinido, el sensor AgrA fosforilado en arreglo con otros elemento reguladores, tal como SarA, conduce entonces a incrementar considerablemente la transcripción del promotor P2, amplificando la respuesta, e inicia la transcripción del promotor P3 en la fase de crecimiento logarítmica-tardía, cuando la concentración del sensor en el medio es alto (Ver fig. 10).<sup>18,65,66</sup>

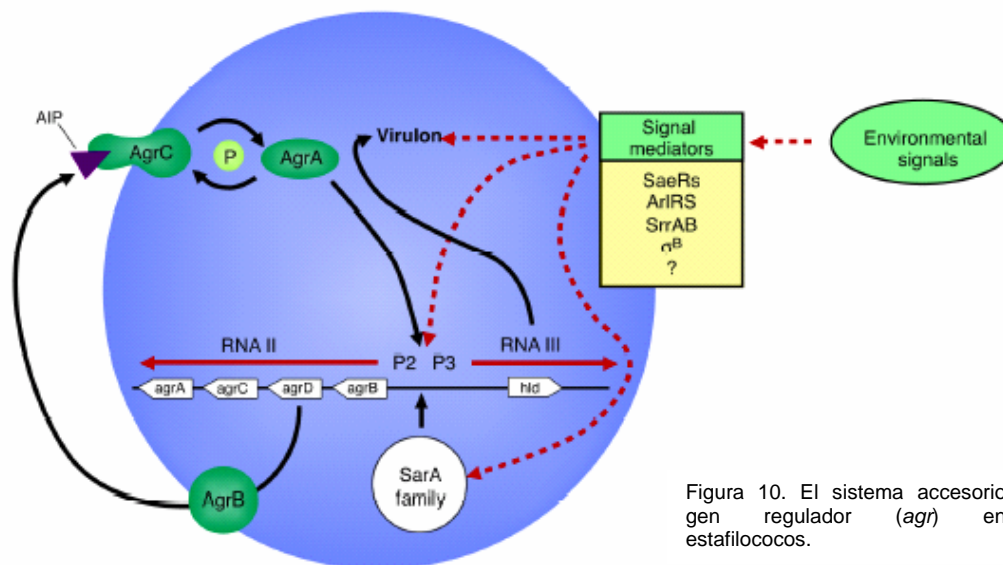


Figura 10. El sistema accesorio gen regulador (*agr*) en estafilococos.

La transcripción acrecentada del operón P3 resulta dramáticamente en un aumento de los niveles de RNA III intracelular, la molécula efectora principal del locus *agr*.<sup>65</sup> RNA III, es un regulador pleiotropico central,<sup>18</sup> que codifica la toxina  $\delta$ -hemolisina (vía *hld*) pero, mucho más importante, incrementa la transcripción (y en algunos casos, translación) de varios factores de virulencia secretados, incluyendo TSST-1, la enterotoxina B y otras hemolisinas como la  $\alpha$ -toxina.<sup>56,65</sup> Sin embargo, algunas toxinas, tales como las enterotoxinas A y K, típicamente se producen en bajas concentraciones y durante la fase exponencial, no son regulados por RNA III. Otras toxinas secretadas, tales como las enterotoxinas B, C, y D, son solo parcialmente reguladas positivamente por RNA III y pueden ser producidas en altas concentraciones independientemente de *agr*.<sup>65</sup> Al mismo tiempo, disminuye la expresión de varios factores de virulencia de superficie celular como las adhesinas, incluyendo la proteína A y la proteína fijadora de fibronectina.<sup>56,65,66</sup>

Originalmente, Ji *et al.*,<sup>25</sup> describió que la AIP producida por una cepa dada de *S. aureus* activa su propio locus *agr* pero puede inhibir la expresión de *agr* en otras cepas. Este fenómeno –debido al polimorfismo en una región variable del locus *agr* conteniendo secuencias de nucleótidos que codifican AgrD, dos tercios de la

---

---

terminal-C de AgrB, y una porción de la mitad de la terminal-N de AgrC- a permitido la clasificación de los aislamientos de *S. aureus* en al menos cuatro diferentes grupos de interferencia *agr* (grupos I a IV).<sup>18</sup> Así, aislamientos de un grupo *agr* son capaz de activar la respuesta *agr* en aislamientos del mismo grupo, pero ellos usualmente inhiben esto en miembros de los otros grupos.<sup>52</sup> Este tipo de interferencia bacteriana sugiere que puede influir ecológicamente en el hospedero realzando o inhibiendo la habilidad de un aislamiento de *S. aureus* para colonizar (o competir) en la presencia de cepas residentes, incluyendo otros estafilococos.<sup>18,52</sup> Los efectos adoptados dentro del hospedero de los polimorfismos de *agr* son probables también a afectar la transmisión hospedero a hospedero y la epidemiología de clonas de *S. aureus*.<sup>52</sup>

## **1.11. Amplificación *in vitro* del DNA: Reacción en cadena de la polimerasa o PCR**

### **1.11.1. Definición y fundamento**

En algunos casos, la resistencia de *S. aureus* a la meticilina y oxacilina no puede detectarse en el antibiograma convencional (por técnica de difusión ni de dilución), porque la expresión fenotípica de la resistencia, en ocasiones, no tiene lugar bajo las condiciones estándar de cultivo utilizadas para realizar el antibiograma. Una de las mejores maneras de estudiar esta resistencia, es mediante la amplificación por PCR, es decir, reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”, PCR) de el gen que codifica la PBP2a (*mecA*).<sup>45</sup> La PCR es el camino más sólido y confiable de detección de estafilococos resistentes a oxacilina, y los resultados de este ensayo de PCR son usados como un “estándar de oro” para comparar métodos de “screening” para identificar MRSA.<sup>16</sup>

La técnica PCR, fue descrita en 1985 por K. Mullis y cols., y permite la amplificación (aumento del número de copias) *in vitro* de regiones específicas del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) del que se dispone inicialmente y facilita la manipulación posterior de los fragmentos

---

---

amplificados.<sup>13,15,26</sup> La enorme utilidad y versatilidad de la PCR hace que sea muy utilizada en forma artesanal (PCR caseras) en los laboratorios de diagnóstico.<sup>45</sup>

El principio de la PCR se basa en el uso de dos oligonucleótidos (fragmentos cortos de DNA monocatenarios de unos 20 a 30 nucleótidos, sintetizados artificialmente, llamados cebadores o iniciadores del inglés “primers”) que son complementarios, respectivamente, a secuencias que flanquean una región específica del DNA molde, es decir, a los dos extremos 3´ de la región diana; así como también en ciclos de amplificación repetidos de tres simples reacciones utilizando cambios de temperatura.<sup>13,17,26,45</sup> El primer paso de este procedimiento consiste en la desnaturalización de la doble cadena de DNA original a temperatura elevada, en el segundo paso se lleva a cabo el alineamiento de los oligonucleótidos con las secuencias complementarias, y el tercer paso consiste en la síntesis del fragmento de interés de DNA, por extensión de los oligonucleótidos por una enzima polimerasa de DNA.<sup>13,26</sup>

### **1.11.2. Etapas del proceso**

El proceso de la PCR consta de dos etapas:

La primera etapa esta constituida por los componentes para realizar la amplificación, como son: el DNA (templado), el magnesio Mg<sup>++</sup>; las concentraciones iguales de desoxinucleótidos trifosfato (deoxiguanina trifosfato [dGTP], deoxicitosina trifosfato [dCTP], deoxitimidina trifosfato [dTTP] y deoxiadenina trifosfato [dATP]), la polimerasa de DNA termoestable como la *Taq* polimerasa (obtenida de una bacteria termófila, *Thermus aquaticus*), la solución reguladora a pH 8.0-8.5, y los dos oligonucleótidos.<sup>13,17,26,45</sup> En realidad estos reactivos se incorporan simultáneamente en un tubo para formar la *master mix*, que es la mezcla de estos componentes que se someterá a amplificación.<sup>45</sup>

La segunda etapa está constituida por estados alternos de temperatura también conocido como sistema de calentamiento y enfriamiento, y permite la amplificación

---

---

del fragmento delimitado entre los dos cebadores mediante el siguiente proceso:<sup>13,15,17,26,45</sup>

- *Desnaturalización*: las dos cadenas de la molécula original de DNA unidas por enlaces de hidrógeno se separan por el calor a 94-95 °C durante 15 segundos a 1 minuto.
- *Hibridación o alineamiento (annealing)*: la mezcla se enfría a una temperatura entre 37 y 65 °C durante unos 30 segundos (renaturalización), temperatura que permite la hibridación, por lo que los cebadores se unen específicamente a sus secuencias complementarias, uno en cada hebra, delimitando un fragmento entre ellos, ya que la renaturalización del DNA original entre sí es mínima porque los cebadores están en exceso.
- *Polimerización o extensión*: se lleva a cabo durante 30 segundos a cinco minutos a 72 °C, que es la temperatura óptima para la actividad de la *Taq*-polimerasa. El templado de los cebadores a las secuencias blanco (fragmentos bicatenarios DNA-cebador) proporciona el formato o la plantilla necesaria que permite que la DNA polimerasa agregue los desoxinucleótidos (dNTP) a los extremos 3' de cada cebador y se produzca por extensión una secuencia complementaria a la plantilla blanco, produciéndose de tal forma las copias de ambas cadenas.

El número de segmentos de DNA amplificados se duplica después de cada ciclo, el cuál consiste de los tres pasos anteriores. Este proceso tiene lugar en un instrumento automático, denominado termociclador, que va variando la temperatura según el programa señalado, se repite automáticamente a lo largo de 20 a 40 ciclos durante unas dos o tres horas según las necesidades de amplificación hasta llegar a conseguir millones de copias del blanco ( $10^7$  a  $10^8$ ) en la mezcla de reacción.<sup>13,26,45</sup>

Además de las tres etapas de cada ciclo, comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos. La previa, a elevada temperatura (incluso superior a la de las etapas de desnaturalización), sirve básicamente para



---

---

inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del DNA de partida, especialmente si este es de gran tamaño o posee regiones muy compactadas (caso de un DNA genómico completo). La etapa final, por su parte, consiste en una prolongación de la última elongación, para permitir que se completen todos los fragmentos.

Las secuencias amplificadas o *amplicones* pueden ser detectados si hay suficiente DNA amplificado a través de un corrimiento electroforético en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y posteriormente analizado con luz ultravioleta al mismo tiempo con testigos de DNA original o marcadores de peso molecular que permitan identificar el segmento amplificado (es decir, el tamaño de la secuencia blanco amplificada depende de los cebadores elegidos para la PCR).<sup>13,17</sup> Es recomendable que al hacer un ensayo se incluyan controles positivos y negativos.<sup>13</sup>

La importancia de este procedimiento es su especificidad, sensibilidad y su habilidad para amplificar DNA impuro, incluso a partir de una mezcla de otros DNA y otras sustancias. Se ha comprobado que la amplificación puede empezar en una muestra conteniendo únicamente una molécula de DNA específico, lo que ha hecho de estos ensayos la más sensible detección para secuencias específicas de DNA. La especificidad de la PCR deriva de la precisión de la igualdad de los oligonucleótidos con la alineación de las cadenas de DNA-DNA original.<sup>13</sup>

### **1.11.3. Factores importantes para la optimización de las reacciones de PCR**

Para la optimización de las reacciones de PCR ha de tenerse en cuenta numerosos factores, entre los que destacan el diseño de los cebadores, la selección de una temperatura de renaturalización óptima para conseguir una buena especificidad de hibridación de los cebadores con su diana, la concentración óptima de determinados elementos químicos de la solución y el pH adecuado, ya que pueden presentarse varios errores, algunos de ellos detectables por incorporaciones erróneas, algo que se considera correcto e incorrecto.<sup>26,45</sup>

- 
- 
- a) *dNTP*. Concentraciones de 20 a 200  $\mu\text{M}$  de cada uno resultan en un balance óptimo entre el campo, la especificidad y la fidelidad. Los cuatro *dNTP* deben ser utilizados en concentraciones equivalentes para minimizar errores de mala incorporación. La inespecificidad y fidelidad de la PCR se incrementan al reducir las concentraciones de *dNTP* a las originalmente recomendadas.<sup>26</sup>
- b) *MgCl<sub>2</sub>*. Muchos templados requieren la optimización de la concentración del ión magnesio para la eficiente y correcta amplificación.<sup>55</sup> La concentración de magnesio en la mezcla de reacción debe ser de 0.5 a 2.5  $\mu\text{M}$ .<sup>26</sup> El ión magnesio es requerido como co-factor para todas las DNA-polimerasas. Por otra parte, la concentración del ión magnesio puede afectar en lo siguiente: 1) alineamiento del oligo; 2) temperatura de disociación de la cadena para el templado y el producto; 3) especificidad del producto; 4) formación de artefactos dimero-oligo y fidelidad de la enzima.<sup>55</sup>
- c) *Cebadores*. La temperatura y el tiempo influyen igualmente en el reconocimiento de los cebadores y el DNA (una de las cadenas). La temperatura óptima depende de la composición de bases, longitud y concentración (de los cebadores) y de la composición del medio, entre otros factores. Si esa temperatura es demasiado baja, hay uniones inespecíficas, y, si es muy alta, pueden no unirse a su diana. Generalmente la temperatura de alineamiento es de 5 °C por debajo de la temperatura calculada para el alineamiento de los cebadores, y como la polimerasa *Taq* está activa en este rango de temperaturas, el alineamiento debe llevarse a cabo a temperaturas menores. La temperatura de fusión de los iniciadores ( $T_m$ ) se calcula de la siguiente manera:  $T_m = 2[A+T] + 4[G+C] = -5 \text{ °C}$ .<sup>26,45</sup> La  $T_m$  es la temperatura a la cual el 50% de los oligonucleótidos pares se disocian.<sup>13</sup>

La concentración ideal del “cebador” se encuentra entre 0.1 y 0.5  $\mu\text{M}$ , por lo que las concentraciones altas pueden provocar incorporaciones erróneas, es decir, acumulación de producto no específico. Debe evitarse la complementariedad en el extremo 3' de los “cebadores”, ya que promueve la formación de “cebador dímero”.<sup>26</sup>

---

---

d) El tiempo de amplificación en la reacción de incorporación de los dNTP para formar la nueva cadena depende de la longitud y concentración del DNA inicial (templado). El rango de incorporación de nucleótidos es de 35 a 100 por segundo, lo cual depende de la concentración salina en el amortiguador y la naturaleza del DNA templado. Una duración de 1 minuto a 72 °C se considera suficiente para los productos de hasta 2 kb de longitud.<sup>26</sup>

#### **1.11.4. Limitaciones de la PCR**

Entre los problemas que plantea la técnica de la PCR, está la presencia de inhibidores en las muestras. Por ejemplo, diversos productos orgánicos que se hallan naturalmente en las muestras clínicas (sangre [heme], ácidos biliares, polisacáridos del esputo) e incluso sustancias como la heparina, el duodecil sulfato sódico o el cloruro de guanidina, que se utilizan en diferentes procesos de manipulación de los ácidos nucleicos; sin embargo, muchos inhibidores no han sido identificados.<sup>45</sup>

También hay que tener en cuenta que sólo se pueden amplificar fragmentos de DNA de una determinada longitud más allá de la cual la polimerasa deja de actuar. El tipo de polimerasa, entre otros parámetros, condiciona la longitud del fragmento que puede sintetizarse eficazmente.<sup>45</sup>

Otro problema importante son las contaminaciones, que pueden ser de dos tipos diferentes: la contaminación puntual de una muestra negativa por otra positiva durante el proceso inicial de extracción del DNA y la contaminación general del laboratorio con los amplicones de una PCR previa.<sup>45</sup>

#### **1.11.5. Variantes del método: PCR múltiple (*Multiplex PCR*)**

La gran capacidad de amplificación de la PCR estimuló el desarrollo de varias modificaciones que aumentan la eficacia de esta metodología, en particular para los métodos diagnósticos. Algunos ejemplos específicos son la PCR múltiple (*Multiplex PCR*), la PCR anidada (*Nested PCR*), la PCR con cebado aleatorio

---

---

(PCR [Huella Digital]): RAPD y AP-PCR; la PCR cuantitativa, la PCR con transcripción inversa (RT-PCR) y la PCR en “tiempo real”.<sup>17</sup>

La PCR múltiple es un método en el que se incluye más de un par de cebadores diferentes para distintos fragmentos de DNA en la mezcla de PCR, amplificándose simultáneamente diferentes dianas del DNA de un microorganismo.<sup>17,45</sup>

Este método ofrece algunas ventajas notables. Primero, pueden desarrollarse estrategias que incluyan controles internos para la PCR, por ejemplo: en una bacteria puede detectarse simultáneamente un fragmento genómico específico de especie y un fragmento del gen de resistencia a un antibiótico con dos juegos de cebadores (un par cebadores controles o universales, y otro par de cebadores de la prueba, respectivamente) determinando en una sola PCR la especie y la resistencia al antibiótico del microorganismo.<sup>17,45</sup> El amplicón control siempre debe ser detectable después de la PCR y su ausencia indicaría que las condiciones de la PCR no eran óptimas y la prueba debe repetirse. Cuando se detecta el amplicón control, la ausencia del amplicón de la prueba puede interpretarse de manera más confiable como indicadora de la ausencia de ácido nucleico blanco en la muestra, en lugar de un defecto del sistema de PCR.<sup>17</sup>

Otra ventaja de la PCR múltiple como ya se dijo anteriormente, es la capacidad para buscar blancos diferentes con una sola reacción. Pueden reunirse pares de cebadores dirigidos a secuencias específicas de diferentes microorganismos o genes, con lo que se reduce el uso de múltiples recipientes de reacción.<sup>17</sup>

Una limitación de la PCR múltiple es que la mezcla de diferentes cebadores puede causar interferencia en el proceso de amplificación, de forma que puede ser difícil optimizar las condiciones de la reacción, sobre todo a medida que aumenta el número de pares de cebadores diferentes usados.<sup>17</sup> Por lo tanto, para realizar este tipo de PCR, debe asegurarse la compatibilidad de la temperatura de hibridación de los diferentes cebadores, así como la ausencia de hibridación entre ellos. De todas maneras, ha de tenerse en cuenta que las reacciones inespecíficas suelen ser más frecuentes que en la PCR simple.<sup>45</sup>

---

---

## 1.12. Electroforesis

La electroforesis es una técnica de separación enormemente importante en el procedimiento rutinario del análisis de los ácidos nucleicos y proteínas.<sup>42,64</sup>

La electroforesis se basa en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (solución amortiguador de electroforesis), a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su movilidad electroforética, que depende de la carga, el tamaño o peso molecular y la forma de la misma.<sup>42,64</sup>

Para controlar el avance de la separación de las moléculas en la matriz y establecer un patrón de fragmentos, las moléculas deberán ser teñidas con diferentes colorantes. Estos pasos facilitan la visualización de las moléculas a manera de simples bandas las cuales serán posteriormente analizadas e interpretadas.<sup>64</sup>

Esta técnica tiene aplicación en la detección, identificación, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) e incluso preparación y purificación (por extracción de banda desde el gel) de moléculas y fragmentos de DNA y RNA. Por lo que se trata, sin duda, una de las técnicas básicas en el trabajo con ácidos nucleicos.<sup>42</sup> También, es importante señalar que la electroforesis en asociación con otras técnicas tales como PCR, e hibridación, brinda una gran ayuda en el campo de la salud. Gracias a esta técnica es posible visualizar las bandas de RNA o DNA de patógenos, detectar cambios o mutaciones a nivel genético, visualizar una nueva proteína, entre otros.<sup>64</sup>

### 1.12.1. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

El objetivo de la electroforesis de DNA es separar las moléculas de DNA de acuerdo a su peso molecular a través de geles de agarosa.<sup>64</sup> Los ácidos nucleicos tienen carga negativa determinada por el grupo fosfato de su esqueleto molecular, por lo que migran hacia el polo positivo (rojo) cuando se aplica la corriente.<sup>26</sup>

---

---

La agarosa es un polisacárido de estructura lineal, componente principal del agar, que se obtiene a su vez de algas marinas. Es insoluble en medios acuosos a temperatura ambiente, pero se disuelve en ello a 100 °C. Cuando la disolución se enfría, la agarosa gelifica, formando una matriz microscópica por cuyos poros pueden desplazarse moléculas de ácidos nucleicos de dimensiones medias (hasta 40-50 kb) cuando se les coloca en un campo eléctrico. Se trata de uno de los soportes electroforéticos más usados en el trabajo habitual con fragmentos de DNA.<sup>42</sup>

La electroforesis en gel de agarosa consiste de tres etapas: 1) Preparación del gel de agarosa; 2) Desarrollo de la electroforesis; y 3) Visualización de bandas de DNA por coloración con bromuro de etidio, que se basa en la propiedad del bromuro de etidio para intercalarse entre las bases del DNA y posteriormente fluorescer frente a la exposición con rayos ultravioleta (Ver anexo II).<sup>42,64</sup>

#### **1.12.1.1. Factores que influyen en el resultado de la electroforesis**

La eficacia en la separación de los ácidos nucleicos en geles de agarosa es función de diversos factores que suelen confundir los resultados finales, por lo que se recomienda al investigador estandarizar algunos parámetros importantes que en la práctica suelen pasar desapercibidos.<sup>42,64</sup> Estos factores pueden ser:

*Concentración de la agarosa.* Una molécula de DNA migrará y se distribuirá de modo diferente a medida que varíe la concentración de la matriz de agarosa. Así, por ejemplo, con un gel de agarosa al 0.7% se puede conseguir una buena separación de fragmentos de DNA cuyo tamaño vaya desde 0.5-0.7 kb hasta 10-12 kb. Cuanto mayor es la concentración de la agarosa (dureza) del gel, por ejemplo del 1.2%, los fragmentos de DNA de tamaño grande no se separan bien, pero los pequeños se resuelven mejor. Las agarosas normales se preparan en disoluciones cuyas concentraciones van desde menos del 0.5% (geles muy blandos) hasta por encima del 2% (p/v) (geles muy duros) y permiten separar fragmentos de DNA de tamaños entre 100 pb y 30 kb.<sup>42,64</sup>

---

---

*El amortiguador de electroforesis*, es el encargado de mantener el pH y de aportar una concentración salina adecuada. La migración del DNA es afectada por la composición y la fuerza iónica del amortiguador de electroforesis. Si la concentración iónica es muy baja, la conductividad eléctrica disminuirá drásticamente, y en consecuencia, la migración del DNA sería casi nula. Si la concentración de iones fuera excesivamente alta, la conductividad eléctrica sería muy eficiente y se generaría un sobrecalentamiento del amortiguador. El calor excesivo podría causar la licuación de la agarosa o la desnaturalización del DNA. Actualmente se dispone de distintos amortiguadores para electroforesis de DNA de doble hebra. Los más usados son el amortiguador Tris ácido acético EDTA (TAE) y el Tris Borato EDTA (TBE).<sup>42,64</sup>

*Voltaje o campo eléctrico aplicado.* Este parámetro es muy importante en la electroforesis ya que es responsable de la movilidad electroforética de las moléculas de DNA de un polo a otro. Para valores no muy altos, la velocidad de migración de una molécula lineal es proporcional al voltaje aplicado. A bajos valores del campo eléctrico se consiguen mejores separaciones de moléculas grandes, mientras que los fragmentos pequeños se resuelven mejor cuando se utilizan voltajes mayores. Es de resaltar que el aumento de la fuerza del campo eléctrico (aumento de voltaje) incrementa la movilidad de las moléculas de DNA de alto peso molecular de manera indistinta. Ello genera que las moléculas no se separen completamente unas de otras pese a aumentar la velocidad de la electroforesis. En consecuencia, se recomienda no aplicar más de 5 V/cm para moléculas de DNA mayores de 2 Kb. La electroforesis en geles de agarosa se suelen desarrollar a un voltaje comprendido entre 1 y 10 V/cm (de distancia entre electrodos).<sup>42,64</sup>

*Temperatura* En geles de agarosa la temperatura también no es un factor que influya sobre la migración del DNA. En ese sentido no existen diferencias de movilidad de las moléculas de DNA desde 4.°C a 30.°C. Sin embargo, cuando se eleva mucho (cambio que puede ocurrir al aumentar el voltaje de electroforesis o por la alta fuerza iónica del amortiguador), afecta la calidad de la separación,

---

---

provocando distorsión en las bandas. En concentraciones de agarosa de por debajo del 0,8%, un eventual aumento de temperatura por encima de 50 °C puede generar la licuación del gel y en consecuencia la pérdida de la muestra del DNA. La resistencia planteada al paso de corriente por la matriz de agarosa es muy pequeña, por lo que la producción de calor por este motivo también lo es. El desarrollo de geles sumergidos en la disolución tampón (geles submarinos) facilita la eliminación del calor y el mantenimiento de una temperatura constante.<sup>42,64</sup>

*Composición de las bases.* En geles de agarosa la composición de las bases del DNA (% de pares GC) o la secuencia de bases no afecta la movilidad de las moléculas de DNA.<sup>42,64</sup>

*Tamaño del DNA.* Generalmente la tasa de migración del DNA es inversamente proporcional al logaritmo 10 (log<sub>10</sub>) del número de pares de bases que conforman la molécula. Esto significa que las moléculas de DNA más grandes generalmente migran más lentamente que las más pequeñas.<sup>64</sup>

*Conformación del DNA.* La conformación de las moléculas de DNA que atraviesan el gel también afecta, y mucho, a su movilidad eléctrica. Un ejemplo de ello son los plásmidos que son moléculas de DNA que a pesar de presentar el mismo peso molecular adoptan conformaciones estructurales diferentes que en la mayoría de los casos generan estructuras superenrolladas, formas lineales o formas circulares menos enrolladas o relajadas.<sup>42,64</sup>

La gran potencia separativa de la electroforesis en gel de agarosa la ha convertido en la técnica analítica más aplicada al trabajo con ácidos nucleicos. Además de permitir la caracterización de fragmentos de DNA (determinación de tamaño y peso molecular), lo que será la base para la construcción de mapas físicos, contribuye a definir la pureza de una preparación, la complejidad de una mezcla e incluso la cantidad aproximada de material presente en una banda mediante su comparación con otras previamente calibradas.<sup>42</sup>



---

---

Además del tipo de electroforesis en agarosa que se acaba de describir, hay otras modalidades de la técnica con aplicación a casos no tan generales pero igualmente importantes como: electroforesis en campo pulsado, electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa y electroforesis preparativa.<sup>42</sup>

## **1.12.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)**

### **1.12.2.1. Definición, fundamento y proceso**

Durante las últimas décadas, diversos métodos de tipificación, primero fenotípicos, después genotípicos, han sido usados para seguir y monitorear brotes de MRSA. Entre estos, la electroforesis en campo pulsado (“Pulse Field Gel Electrophoresis”, PFGE) de fragmentos genómicos de macrorestricción ha emergido como el método estándar de oro de tipificación molecular para la epidemiología de MRSA.<sup>20</sup>

La PFGE es una variación de la electroforesis clásica que permite separar y analizar fragmentos de DNA muy grandes, de tamaño superior a los  $2 \times 10^6$  pb (2 Mb).<sup>42</sup>

El principio de la PFGE es el uso de un dispositivo de electroforesis especializado para separar fragmentos cromosómicos producidos por la digestión enzimática del DNA del cromosoma bacteriano intacto.<sup>17</sup>

El método que se sigue normalmente pasa por sedimentar y lavar bien las células del material de partida (cultivo en caldo Infusión cerebro corazón [“Brain Heart Infusion”, BHI])<sup>39</sup> e incluirlas en bloques de agarosa. Para ello se usan agarosas de bajo punto de gelificación, lo que permite que, después de fundirla, la temperatura de la disolución puede rebajarse a valores donde las moléculas de DNA no sufren demasiado; las células se añaden a ese medio, todavía líquido, y entonces se deja que gelifique en moldes adecuados.<sup>42</sup>

Luego, en el interior del bloque de agarosa, se procede a la lisis de las células (in *situ*) y a su tratamiento con proteasas para liberar al DNA de la proteínas que lo

---

---

acompañan.<sup>17,42,58</sup> A continuación el DNA se digiere mediante enzimas endonucleasas de restricción. Se seleccionan enzimas que tengan pocos sitios de restricción en el DNA genómico, de forma que se produzcan 10 a 20 fragmentos de un tamaño de 10 a 1.000 kb.<sup>17,58</sup>

El bloque de agarosa que contiene los fragmentos de DNA cromosomal, es introducido en el pozo de un gel de agarosa y directamente se procede al desarrollo de la electroforesis.<sup>42,58</sup> Debido al gran tamaño de los fragmentos de DNA producidos, existe una mayor probabilidad de que se formen estructuras en horquillas y “se enganchen” en la retícula del soporte, por lo que para salir de esta situación necesitan reorientarse. La PFGE incorpora un cambio periódico de la dirección del campo eléctrico entre dos o más ángulos preestablecidos a través del gel de agarosa, lo que se denomina *pulso*. Esto facilita mucho la reorientación de los fragmentos de DNA y permite su separación en geles de agarosa.<sup>17,42</sup> Se suelen utilizar geles de concentraciones semejantes a las usadas en la electroforesis normal, aunque se emplean agarosas especialmente puras. Se requiere mantener muy constante la temperatura, para lo que se usan distintos sistemas de control y refrigeración.<sup>42</sup>

Los patrones de restricción de DNA de los aislamientos son entonces comparados con otro para determinar su relación.<sup>58</sup>

#### **1.12.2.2. Variables que afectan la resolución del PFGE**

Los resultados de las técnicas de la PFGE son muy sensibles a variaciones en prácticamente todos los parámetros electroforéticos. Las condiciones para obtener la mejor resolución por PFGE están, por supuesto, en función del rango de tamaño de las moléculas a separar y de la enzima de restricción seleccionado, pero también intervienen variables técnicas como:<sup>2</sup>

*Duración y alternancia de los pulsos.* La duración de los campos eléctricos que se alternan determinan el tamaño del DNA que puede separarse. Los pulsos pueden durar fracciones de segundos, para separar moléculas de pocas kb, o pueden

---

---

durar algo más de una hora para separar moléculas mayores de 5 Mb. En general, cuanto mayor es la molécula de DNA, mayor tiempo de reorientación se requiere; las moléculas pequeñas, que pueden reorientarse con rapidez invierten gran parte del tiempo del intervalo de pulso en avanzar a lo largo del gel.<sup>2</sup> Existen diversos sistemas de PFGE que se diferencian en cuanto a la forma de modificación de la dirección del campo. En la mayoría de ellos, el programa de pulsos viene controlado. Existe, incluso, la posibilidad de programación por parte del usuario, ampliando al máximo las posibilidades del sistema.<sup>42</sup>

*Voltaje.* El uso de distintos voltajes afecta no solo la distancia de migración sino también el rango de tamaños que pueden separarse. Así, para obtener una resolución comparable en geles procesados a diferentes voltajes, debe modificarse no solo el tiempo de electroforesis, sino los intervalos de pulso para compensar las diferencias en la migración de DNA. Utilizar un voltaje inferior requiere intervalos de pulso más largos para obtener resultados similares. A voltajes bajos, las moléculas de DNA requieren más tiempo para reorientarse y avanzar tras la alternancia del pulso eléctrico.<sup>2</sup>

*Temperatura de electroforesis.* La recirculación del tampón de electroforesis y el mantenimiento de una temperatura constante son condiciones indispensables para obtener resultados reproducibles. Temperaturas entre 12 y 14 °C son las más habituales. A medida que la temperatura aumenta, el DNA avanza más rápido pero disminuye la resolución de las bandas en el gel.<sup>2</sup>

*Tiempo de electroforesis.* Debe intentarse mantener el tiempo mínimo de electroforesis necesario para obtener una resolución adecuada. En electroforesis largas la presencia de nucleasas residuales puede contribuir a la degradación del DNA, además, las bandas pierden definición en la zona más distal del gel.<sup>2</sup>

*Amortiguador de electroforesis.* De la composición de este depende la intensidad de la corriente eléctrica (Ver en electroforesis en gel de agarosa).<sup>2</sup>

---

---

*Angulo de reorientación.* Se entiende por ángulo de reorientación al ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se alternan. Para obtener una resolución adecuada por PFGE se requieren ángulos de reorientación de más de 90°. <sup>2</sup>

### **1.12.2.3. Ventajas y desventajas de la aplicación de la PFGE en MRSA**

La PFGE es un método que ha comprobado ser muy acertado para la investigación de brotes nosocomiales y también ha sido usado para identificar clonas de MRSA que tienen una particular habilidad para causar brotes mayores y extenderse nacionalmente e internacionalmente (clonas epidémicas, MRSA).<sup>12</sup> Este método cumple con la mayoría de los criterios de Maslow para un buen sistema de tipificación: capacidad de tipificación (produce resultados interpretables con claridad con la mayoría de las cepas bacterianas a probar), reproducibilidad (capacidad del método para obtener reiteradas veces el mismo resultado del perfil de tipificación con la misma cepa bacteriana) y altamente discriminatorio (produce resultados que permiten la diferenciación clara de dos cepas no relacionadas de la misma especie bacteriana), de manera que esto ha sido comprobado en exámenes microepidemiológicos (local o a corto término) y macroepidemiológicos (nacional, continental, o a largo término).<sup>17,20,60</sup>

La PFGE es también sensible, ya que detecta pequeñas variaciones que se acumulan rápidamente en el genoma bacteriano. Así, es muy poco probable, por ejemplo, que dos pacientes sean infectados al azar por dos cepas que muestran el mismo tipo molecular, por lo que este método marca, con escaso margen de error, la existencia de una conexión epidemiológica entre ambos casos.<sup>60</sup> La PFGE también puede usarse para determinar si una infección recidivante en el mismo paciente se debe a que el tratamiento original fue insuficiente, quizá como el resultado del desarrollo de resistencia a antimicrobianos durante el tratamiento, o se debe a la adquisición de una segunda cepa, más resistente, de la misma especie. En cualquier caso, esta aplicación de la PFGE muestra que el método no sólo es útil para investigar brotes o diseminación de cepas que involucran a varios

---

---

pacientes, sino que también ofrece la oportunidad de investigar características de las reinfecciones, fallas de tratamientos y de las infecciones mixtas que involucran más de una cepa de la misma especie. Por estas razones, la PFGE tiene amplia aceptación entre los microbiólogos, el personal de control de infecciones y los especialistas en enfermedades infecciosas, como herramienta de laboratorio fundamental para la epidemiología.<sup>17</sup>

Sin embargo, esa misma capacidad de detectar fácilmente una rápida acumulación de pequeñas variaciones puede ser una gran desventaja para trazar la dispersión de líneas clonales, ya que se puede perder la capacidad de analizar el origen común de esas variantes.<sup>60</sup>

La PFGE es un método técnicamente demandante y de intensiva labor. Una mayor desventaja de la PFGE, es que es un método que requiere de interpretación subjetiva, pues esta basado en la generación de patrones de bandas de DNA en geles de agarosa y su comparación es en formato de imagen. Así pues, la comparación de resultados entre laboratorios permanece difícil y depende de una estricta adherencia a protocolos estandarizados y criterios de interpretación, por lo que suele existir un alto grado de confusión respecto a los llamados clones epidémicos de *S. aureus* resistentes a la meticilina.<sup>12,20,51,60</sup> En un esfuerzo para hacer de la PFGE un método de tipificación accesible y más fácilmente de entender, el uso de métodos estadísticos y la habilidad para digitalizar y guardar imágenes y comparar patrones usando programas software correspondientes ha realizado este método. Tales métodos pueden ser apropiados para largas colecciones de aislamientos estudiados en laboratorios de referencia, pero factiblemente ninguno de ellos no es necesario para los laboratorios que serán confrontados primeramente con brotes a corto término. Sin embargo, aún así sigue siendo un problema entre los laboratorios, y la información basada en imágenes resulta en un trabajo arduo para organizar la rápida búsqueda y recuperación por computadora.<sup>51,58,60</sup>

---

---

Algunos autores han discutido que la estabilidad de marcadores puede ser insuficiente para la confiable aplicación de la PFGE a largo término o en estudios macroepidemiológicos. Sin embargo, en un estudio realizado por Hallin *et al.*,<sup>20</sup> mostraron una excelente concordancia entre PFGE y MLST (“Multilocus sequence typing”), y entre el tipo de PFGE mas el tipo de SCC*mec* y el tipo de clona, que no solo validan el uso de la PFGE en estudios de vigilancia epidemiológica a nivel nacional o a largo término, sino que también proporciona unas buenas bases para un cambio de nomenclatura entre MLST (con o sin tipo de SCC*mec*) y tipo de PFGE (con o sin tipo de SCC*mec*). En este estudio también demostraron que la tipificación de la proteína estafilocócica A (“staphylococcal protein A gene”, *spa*) puede ser usado para el mismo propósito pero con alguna precaución, sugiriendo marcadores adicionales, tales como tipo de SCC*mec* y genes de virulencia o resistencia, y MLST. McDougal *et al.*,<sup>39</sup> mencionan que un sistema de tipificación nacional basado en PFGE debe ser validado con datos de MLST y tipificación de *spa* para mantener continuamente con la nomenclatura ya establecida en la literatura.

---

---

### 1.13. JUSTIFICACIÓN

El incremento en los patrones de resistencia antimicrobiana, como resultado de la presión selectiva por el creciente uso de antibióticos, ha convertido y establecido a *S. aureus* como un importante patógeno nosocomial a nivel mundial; y recientemente ha evolucionado y emergido como una mayor causa de infecciones adquiridas en la comunidad, por lo que son una amenaza significativa para la salud pública. En México estudios han reportado que la frecuencia de MRSA es del 7 al 30% en nosocomios; sin embargo, son muy pocos los reportes que describen las características genotípicas que guardan dichos aislamientos. Por lo tanto, en este protocolo se pretende conocer además de los patrones de susceptibilidad, las características genotípicas de los aislamientos reportados en el HIMFG que es un hospital de tercer nivel y los resultados pueden servir de referencia a nivel nacional e internacional en la determinación de brotes en forma oportuna y tomar medidas necesarias para su control y prevención.

---

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

- Identificación de los genes *agr*, *mecA* y PVL en *S. aureus* aislados de procesos infecciosos nosocomiales y de portadores asintomáticos, por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para conocer las características genotípicas que guardan dichos aislamientos.

### 2.2. Objetivos particulares

- Determinar la susceptibilidad a aislamientos de *S. aureus* a oxacilina.
- Determinar el fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>), a todos los aislamientos de *S. aureus*.
- Identificar el gen *mecA* y caracterizar el tipo de SCC<sub>mec</sub> en aislamientos MRSA.
- Identificar los genes *agr* y PVL en las cepas MRSA y MSSA.
- Determinar la huella genómica de los aislamientos MRSA.



---

---

### 3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

#### 3.1. Validación de cepas *S. aureus* aislados de infecciones nosocomiales pertenecientes al cepario del laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) y de portadores asintomáticos

Durante el 2006, en el laboratorio de Bacteriología Intestinal del HIMFG se desarrolló un estudio en el cuál se obtuvieron a partir del cepario un total de 29 aislamientos de *S. aureus* provenientes de infecciones nosocomiales (Cuadro III) y 41 de portadores asintomáticos nasofaríngeos.

Cuadro III. Número de aislamientos de infecciones nosocomiales originadas por <i>S. aureus</i> en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.	
INFECCIÓN	# DE AISLAMIENTOS
Bacteriemia primaria	1
Bacteriemia relacionada a líneas y terapia intravascular	14
Bacteriemia secundaria (Infección del sitio de inserción de catéter)	1
Bacteriemia secundaria (infección de herida quirúrgica superficial)	1
Bacteriemia secundaria (neumonía)	1
Infección del sitio de inserción de catéter, túnel o puerto subcutáneo	1
Infección de sitio de inserción del catéter	1
Infección de herida quirúrgica superficial	2
Infección de herida quirúrgica profunda	1
Infección de vías urinarias	1
Ventriculitis	1
Peritonitis no quirúrgica (diálisis)	3
Mediastinitis	1
Total	29

---

---

Se recuperaron los aislamientos en placas de agar sangre con 5% de sangre de carnero por dilución o estría cruzada y se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. Después del tiempo de incubación, se inició la validación de los aislamientos aplicando las pruebas de identificación bacteriana para *S. aureus*.

### **3.2. Pruebas de identificación bacteriana: macroscópica, microscópica y bioquímica**

**3.2.1. Identificación macroscópica.** En agar sangre, las colonias de *S. aureus* presentaron las siguientes características morfológicas: colonias circulares, medianas a grandes, borde entero, superficie lisa, elevación convexa, brillantes, la mayoría de las colonias con pigmentación amarilla y  $\beta$ -hemolíticas.

**3.2.2. Identificación microscópica.** La tinción de Gram (ver apéndice I) se realizó a todos los aislamientos recuperados en agar sangre, observando cocos Gram (+) en forma de racimos de uva (Ver fig. 1).

**3.2.3. Identificación bioquímica.** La identificación bioquímica de *S. aureus* se realizó en base a las siguientes determinaciones: catalasa, oxidasa, crecimiento en caldo BHI con NaCl al 15% y coagulasa (ver apéndice I).

### **3.3. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a oxacilina**

El perfil de susceptibilidad a oxacilina de los aislamientos, se determinó por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) recomendado por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI),<sup>43</sup> que se describe a continuación:

#### ➤ Preparación del inóculo

A partir de un cultivo puro de 18-24 horas de *S. aureus* en agar base sangre suplementado con 5% de sangre de carnero, se realizó una suspensión de cada uno de los aislamientos en 2 mL de solución salina fisiológica al 0.85% (SSF) a una turbidez equivalente a la constante No. 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

---

---

➤ Inoculación de las placas

La suspensión bacteriana estandarizada de cada uno de los aislamientos, se uso para humedecer un hisopo estéril de algodón, y enseguida se sembró en forma masiva sobre la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton (MH). Después de haber inoculado la placa con la suspensión bacteriana, en el centro de la placa, se coloco el disco de oxacilina (1 µg). La placa fue incubada en posición invertida durante 24 horas de 33 a 35 °C (no excediendo los 35 °C). Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron las lecturas correspondientes de los halos y fueron comparados con los puntos de corte establecidos por la CLSI para evaluar la susceptibilidad (Cuadro IV).

En todas las determinaciones se realizó alternadamente un control para la validez de la prueba. La cepa control que se utilizo para el método de Kirby Bauer fue el *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cuadro IV. Valores de corte establecidos por la CLSI para la susceptibilidad a oxacilina por el método de difusión en disco.			
Disco (contenido)	Diámetro halo en milímetros		
	R	I	S
Oxacilina (1µg)	≤ 10	11-12	≥ 13
ATCC 25923	18-24		

### 3.4. Prueba de doble disco eritromicina-clindamicina

La prueba de doble disco eritromicina-clindamicina se realizó a todos los aislamientos de *S. aureus*, de acuerdo a los lineamientos recomendados en la bibliografía.<sup>19,39</sup> Los discos de eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) se colocaron a una distancia de 15 a 20 mm sobre una placa de agar Mueller-Hinton suplementada al 5% de sangre de carnero, la cual fue sembrada en forma masiva con una suspensión bacteriana de *S. aureus* ajustada a una turbidez equivalente

---

---

al 0.5 del Nefelómetro de McFarland. Las placas se incubaron invertidamente a 37 °C y después de las 18 horas, la ausencia de una zona significativa de inhibición alrededor de los dos discos fue tomada para indicar resistencia constitutiva (fenotipo cMLS). La presencia de una zona de inhibición en forma de D alrededor del disco de clindamicina, indica la inducción de la producción de la metilasa por la eritromicina (fenotipo iMLS). La presencia de una zona de inhibición alrededor del disco de clindamicina que no da una forma de D se tomo para indicar el fenotipo M, cuyo mecanismo de resistencia se debe a el eflujo del macrólido vía *msrA* (Ver fig. 11).<sup>19,39,43</sup>

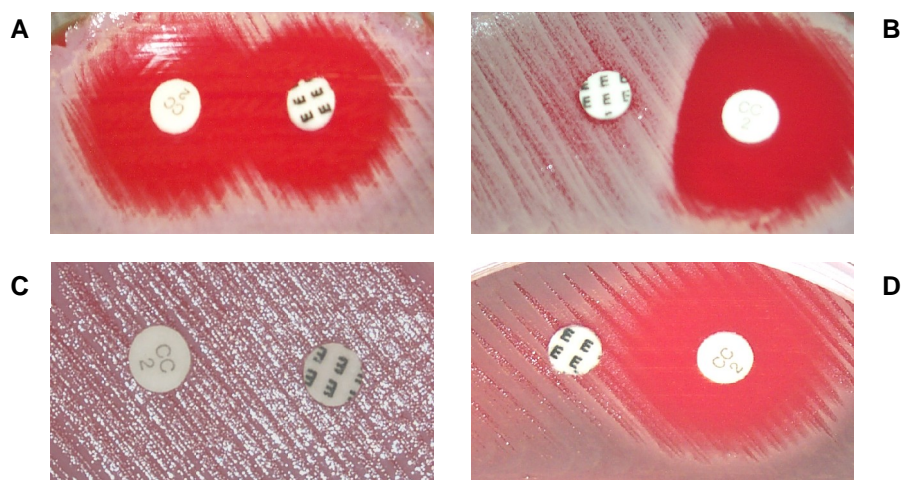


Figura 11. La figura muestra los cuatro fenotipos que se observan al realizar la prueba de inducción a clindamicina de *S. aureus* por la prueba de difusión de doble disco en agar sangre. E, disco de eritromicina (15 µg); CC 2, disco de clindamicina (2 µg). (A) Sensible a ambos antibióticos, (B) fenotipo iMLS o fenotipo D, (C) fenotipo cMLS, (D) fenotipo M.

### 3.5. Técnicas de biología molecular

#### 3.5.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA, a partir de un cultivo puro de 18-24 horas de *S. aureus* en agar base sangre suplementado con 5% de sangre de carnero, se seleccionaron de 3 a 5 colonias de cada uno de los aislamientos y se inocularon en 2 mL de caldo BHI y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C.<sup>24</sup> Un mililitro de la suspensión bacteriana fue transferida a un tubo eppendorf (tubo para

---

---

microcentrifuga) y se centrifugo a 13.000 rpm por 2 minutos, y a continuación se decanto el sobrenadante. El sedimento fue lavado dos veces con 500  $\mu$ L de una solución amortiguadora Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) centrifugando en cada uno de los lavados a las mismas condiciones. Después el sedimento se sometió a un proceso enzimático al que se le adiciono 50  $\mu$ L de lisostafina [0.5 mg/mL], 25  $\mu$ L de proteinasa K [100  $\mu$ g/mL] y 25  $\mu$ L de lisozima [2 mg/mL], incubando a 37 °C por 1 hora. El DNA genómico se extrajo usando el método de extracción de DNA Wizard® Genomic, Promega (Ver apéndice II).

La concentración de DNA se estimo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260nm.<sup>42</sup> El DNA se conservo a -70 °C.

### **3.5.2. Identificación del operón *agr* por PCR**

La amplificación por PCR de un fragmento de 1234 pb correspondiente al operón *agr*, se realizo con los iniciadores Pan-1 (5'-ATG CAC ATG GTG CAC ATG CA-3') y Pan-2 (5'-CAT AAT CAT GAC GGA ACT TGC GCA-3'),<sup>24</sup> en una mezcla de reacción de 25  $\mu$ l que se estandarizó y que contiene: 5  $\mu$ L de DNA templado (100 ng), un amortiguador de reacción al 1X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1.0 U de Taq DNA polimerasa (Promega), 5 pmoles de cada iniciador y agua libre de nucleasas.

La amplificación se realizo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 4 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 2 minutos de alineamiento a 65 °C, 3 minutos de extensión a 74 °C y finalmente una extensión final de 3 minutos a 74 °C.<sup>18</sup> Se utilizo un control de amplificación, al cual no se le adicionó DNA pero si la mezcla de reacción.

---

---

### 3.5.3. Identificación del gen *mecA* y tipificación del *SCCmec* por PCR-Múltiple

El ensayo por PCR múltiple se realizó de acuerdo a Zhang, *et al.*,<sup>68</sup> con algunas modificaciones, el cual contiene 9 pares de iniciadores, incluyendo los iniciadores únicos y específicos para los tipos y subtipos del *SCCmec* I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd, y V, y los iniciadores para el gen *mecA* (Cuadro V). Una alícuota de 2 µL (100 ng) de DNA puro se adiciona a una mezcla de reacción de 23 µL conteniendo un amortiguador de reacción al 1X, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.0 U de *Taq* DNA polimerasa (Promega), varias concentraciones de los respectivos iniciadores (Cuadro V) y agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguidos por 10 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94 °C, 45 segundos de alineamiento a 65 °C, y 1.5 minutos de extensión a 72 °C y otros 25 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 55 °C, y 1.5 minutos a 72 °C, terminando con una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Como controles, se utilizó un control de amplificación y los controles correspondientes al elemento *SCCmec*: tipo I (NCTC10442), tipo II (N315), tipo III (8572082) y tipo IVa (CA05).

Cuadro V. Iniciadores utilizados en la PCR múltiple para la identificación del gen <i>mecA</i> y el tipo de SCC <i>mec</i> .				
Iniciador	Secuencia del iniciador	Concen tración (pmoles)	Tamaño del amplicón (pb)	Especificidad
Tipo I-F Tipo I-R	GCT TTA AAG AGT GTC GTT ACA GG GTT CTC TCA TAG TAT GAC GTC C	4.416	613	SCC <i>mec</i> I
Tipo II-F Tipo II-R	CGT TGA AGA TGA TGA AGC G CGA AAT CAA TGG TTA ATG GAC C	1.472	398	SCC <i>mec</i> II
Tipo III-F Tipo III-R	CCA TAT TGT GTA CGA TGC G CCT TAG TTG TCG TAA CAG ATC G	3.68	280	SCC <i>mec</i> III
Tipo IVa-F Tipo IVa-R	GCC TTA TTC GAA GAA ACC G CTA CTC TTC TGA AAA GCG TCG	2.392	776	SCC <i>mec</i> IVa
Tipo IVb-F Tipo IVb-R	TCT GGA ATT ACT TCA GCT GC AAA CAA TAT TGC TCT CCC TC	2.116	493	SCC <i>mec</i> IVb
Tipo IVc-F Tipo IVc-R	ACA ATA TTT GTA TTA TCG GAG AGC TTG GTA TGA GGT ATT GCT GG	1.794	200	SCC <i>mec</i> IVc
Tipo IVd-F5 Tipo IVd-R6	CTC AAA ATA CGG ACC CCA ATA CA TGC TCC AGT AAT TGC TAA AG	5.29	881	SCC <i>mec</i> IVd
Tipo V-F Tipo V-R	GAA CAT TGT TAC TTA AAT GAG CG TGA AAG TTG TAC CCT TGA CAC C	1.38	325	SCC <i>mec</i> V
MecA147-F MecA147-R	GTG AAG ATA TAC CAA GTG ATT ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T	2.116	147	<i>mecA</i>

### 3.5.4. Identificación de los genes PVL por PCR

La secuencias de los iniciadores para los genes PVL de 433 pb son los siguientes: para pvl 1 5'-ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC-3'; para pvl 2, 5'-GCA TCA AAT GTA TTG GAT AGC AAA AGC-3'.<sup>33,37</sup> La amplificación por PCR se realizo en una mezcla de reacción de 25 µl que se estandarizó y que contiene: 5 µL de DNA templado (100 ng), un amortiguador de reacción al 1X, 0.2 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.0 U de *Taq* DNA polimerasa (Promega), 1.25 pmoles de cada iniciador y agua libre de nucleasas.

---

---

La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineamiento a 55 °C, 1 minuto de extensión a 72 °C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C.<sup>33,37</sup> Como controles, se utilizó un control de amplificación y un control (+) de *S. aureus* ATCC 25923.

### **3.5.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.**

Los productos obtenidos por PCR en cada una de las amplificaciones fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% conteniendo bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL,<sup>64</sup> y visualizados por transiluminación bajo luz ultravioleta. La electroforesis se realizó a 90V, durante 50 min (Ver anexo II).

### **3.5.6. Electroforesis en gel por campos pulsados**

La electroforesis por campo pulsado se realizó de acuerdo a McDougal *et al*,<sup>39</sup> con algunas modificaciones.

#### ➤ Preparación de los bloques de agarosa, lisis celular y desproteinización

A partir de un cultivo puro de *S aureus*, una sola colonia fue inoculada en 5 mL de caldo BHI e incubada con agitación vigorosa de 35 a 37 °C por 24 horas. Un mililitro de la suspensión bacteriana se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se centrifugó a 13.000 rpm por 2 minutos, decantando el sobrenadante. El sedimento fue lavado dos veces con 500 µL de una solución de lavado PIV (Tris-HCl 10mM, NaCl 1M y agua estéril) centrifugando 2 minutos a 13.000 rpm en cada lavado (ver anexo III). El sedimento fue resuspendido en 500 µL de la solución de lavado y 150 µL de la suspensión bacteriana se transfirieron a un nuevo tubo de 0.6 mL, la cual se centrifugó nuevamente retirando el sobrenadante.

145 µL de la solución de lavado + 5 µL de lisostafina [1 mg/mL] fueron adicionados a cada uno de los tubos con el sedimento y se mezclaron suavemente con 150 µL de agarosa (Promega) de bajo punto de fusión ("Low-melting-point", LMP) al 1.8%



---

---

en amortiguador TE 1.0X. La mezcla fue depositada en los moldes para formar los bloques de agarosa, los cuáles se dejaron solidificar a 4 °C por 5 minutos y después fueron removidos del molde y colocados nuevamente en un tubo eppendorf conteniendo al menos 1.2 mL de una solución de lisis EC (Tris-HCl pH 7.6 6 mM, NaCl 1M, EDTA pH 7.6 0.1M, brij 58 0.5%, desoxicolato de sodio 0.2%, sarcosil 0.5%, RNAasa [20 µg/mL], lisozima [0.1 mg/mL] y H<sub>2</sub>O) (Ver anexo III). Los bloques se incubaron toda la noche.

La solución de lisis EC se retiró del tubo eppendorf teniendo cuidado de no dañar los bloques; posteriormente se adicionó 1.2 mL de una solución de desproteinización ESP (EDTA 0.5M pH 9.0, proteinasa K [50 µg/mL], sarcosil 1%) y se incubó a 50 °C por 24 horas (ver anexo III), y la cual se desechó después del tiempo de incubación, adicionando enseguida 1 mL de amortiguador TE. Los lavados con TE se realizaron al menos 3 veces más incubando cada uno a 30 minutos a 37 °C. Los bloques se resuspendieron nuevamente en TE al menos por una hora.

- Restricción enzimática de DNA con *Sma*I y electroforesis de los fragmentos de restricción.

Después de haber cortado cada uno de los bloques a la mitad y colocado uno de ellos en un nuevo tubo eppendorf conteniendo 3 µL de la enzima de restricción *Sma*I (30 U) con su respectivo amortiguador de restricción 1X (ver anexo III), estos fueron incubados a 30 °C por al menos 18 horas. El amortiguador de restricción 1X fue retirado y cada bloque se resuspendió por una hora en 1 mL de TE. Los bloques se cortaron nuevamente a la mitad y cada uno de ellos se cargó directamente en los pozos de un gel de agarosa III grado PFGE (ambresco) al 1% preparado con TBE al 0.5X a partir de un amortiguador TBE 10X.

El corrimiento electroforético se realizó bajo los siguientes parámetros: 200V (6 v/cm); temperatura, 14 °C; cambio inicial, 5s; cambio final, 40s; y un tiempo de 21.5 horas. Después de haberse completado el corrimiento electroforético, el gel fue revelado en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 1.0

µg/mL por 20 minutos y después fue colocado en agua destilada por 45 minutos para eliminar el exceso de bromuro de etidio. El gel fue visualizado por transiluminación bajo luz ultravioleta.

Los patrones de restricción de DNA producidos por PFGE serán interpretados en base a los lineamientos de Tenover, *et al.*,<sup>58</sup> mostrados en el cuadro VI y descritos a continuación, así como también se realizará un dendograma derivado de el “unweighted pair group method using arithmetic averages” (UPGMA) para analizar agrupaciones y basado en el coeficiente de Dice, para identificar los porcentajes de similitud entre los aislamientos, usando un paquete de software.<sup>41,59</sup>

Cuadro VI. Criterios para la interpretación de los patrones PFGE.			
Categoría de relación genética y epidemiológica	No. de diferencias genéticas comparadas con la cepa brote	No. típicos de fragmentos diferentes comparadas con el patrón brote	Interpretación epidemiológica
Indistinguible	0	0	El aislamiento es parte del brote
Cercanamente relacionado	1	2-3	El aislamiento es probablemente parte del brote
Posiblemente relacionado	2	4-6	El aislamiento es posiblemente parte del brote
Diferente	≥3	≥7	El aislamiento no es parte del brote

*Indistinguible.* Los aislamientos son designados genéticamente indistinguibles si sus patrones de restricción tienen el mismo número de bandas y las bandas correspondientes tienen el mismo tamaño aparente. La interpretación epidemiológica de estos resultados es que todos los aislamientos son considerados a representar la misma cepa; los aislamientos que demuestran el patrón común del brote representa la cepa brote. Para muchas especies, los estudios comparativos indican que los aislamientos que son indistinguibles por

---

---

PFGE no son probables a demostrar diferencias substanciales por otras técnicas de tipificación.

*Cercanamente relacionado.* Un aislamiento es considerado a ser cercanamente relacionado a la cepa brote si sus patrones PFGE difieren de el patrón brote por cambios consistentes con un solo evento genético, una mutación puntual o una inserción o delección de DNA. Tales cambios típicamente resultan en dos a tres bandas de diferencia. Por ejemplo, una mutación espontánea que crea un nuevo sitio de restricción cromosomal (un solo evento genético) partirá un fragmento de restricción en dos fragmentos más pequeños. (La suma de los tamaños de los dos fragmentos más pequeños deben ser aproximadamente del tamaño de el fragmento más largo). La pérdida de el fragmento largo original es una banda de diferencia, y la aparición de dos nuevos fragmentos más pequeños representan dos bandas adicionales diferentes; así, son unas tres bandas de diferencia entre el patrón brote y esos de el aislamiento prueba. Tal un aislamiento es considerado a ser cercanamente relacionado a la cepa brote porque por análisis por PFGE, ellos difieren por sólo un singular evento genético. Las variaciones de dos a tres bandas han sido observadas en cepas de algunas especies cuando ellos son cultivados repetidamente sobre tiempo o aisladas múltiples veces de el mismo paciente.

*Posiblemente relacionado.* Un aislamiento es considerado a ser posiblemente relacionado a la cepa brote si su patrón PFGE difiere de el patrón brote por cambios consistentes con dos eventos genéticos independientes (cuatro a seis bandas de diferencia que pueden ser explicadas por simples inserciones o delecciones de DNA o la pérdida o ganancia de sitios de restricción). Mientras estos aislamientos pueden tener el mismo linaje genético como esa de la cepa brote, ellos no son cercanamente relacionados genéticamente y, consecuentemente, son menos probables a ser relacionados epidemiológicamente. Tal variación ha sido observada entre aislamientos colectados sobre un largo período ( $\geq 6$  meses) o tomados de un largo número de pacientes envueltos en brotes extensos. Los aislamientos que son posiblemente relacionados genéticamente pero que no

---

---

tienen unión epidemiológica a las cepas brotes, probablemente difieran por otras técnicas de tipificación.

*No relacionado.* Un aislamiento es considerado no relacionado a la cepa brote si su patrón PFGE difiere del patrón brote por cambios consistentes con tres o más eventos genéticos (generalmente siete o más bandas de diferencia). Típicamente, esto implica que <50% de los fragmentos bien resueltos presentes en el patrón de un aislamiento tal, estará presente en el brote patrón.

El método para reportar los patrones PFGE, primero es el de examinar los patrones para identificar el patrón común o brote, el cuál es supuesto para representar el patrón para la cepa brote. Los patrones de restricción de DNA que son designados al brote patrón son usualmente reportados como tipo A: los aislamientos cuyos patrones de restricción son indistinguibles de ese patrón son reportados a modo que representan la cepa brote. Si aquí no hay un patrón común, entonces los aislamientos son mucho más probable a ser no relacionados. (Entre los aislamientos epidemiológicamente relacionados, la ausencia de un patrón común es un raro evento). Después de identificar el brote patrón, el tamaño y el número de los fragmentos en el brote patrón son comparados con los fragmentos que crean los patrones de los otros aislamientos y son entonces clasificados al menos por su relación con el brote patrón. Así, los patrones que son cercanamente o posiblemente relacionados al brote patrón son considerados subtipos de A y son designados tipo A1, tipo A2, etc. Los aislamientos con patrones de restricción cercanamente o posiblemente relacionados son reportados como probablemente o posiblemente relacionados epidemiológicamente, respectivamente. Los patrones que difieren substancialmente de el brote patrón y esos son clasificados como no relacionados son designados tipo B, tipo C, etc. Los aislamientos con patrones no relacionados son considerados no relacionados epidemiológicamente.

---

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Validación de *S. aureus*.

Los aislamientos de *S. aureus* recuperados del cepario del laboratorio de Bacteriología Intestinal del HIMFG, cumplieron con las características morfológicas y bioquímicas correspondientes para la identificación de *S. aureus* (Cuadro VII), por lo que se procedió a determinar la sensibilidad a oxacilina para clasificarlas en MSSA y MRSA.

Cuadro VII. Pruebas realizadas para la validación de las cepas de <i>S. aureus</i> .	
Determinaciones	Resultados
Morfología colonial en agar sangre	Colonias circulares, medianas a grandes, borde entero, superficie lisa, elevación convexa, brillantes, la mayoría con pigmentación amarilla y betahemolíticas.
Morfología microscópica	Cocos Gram (+) en forma de racimos de uva.
Catalasa	+
Oxidasa	-
Coagulasa	+
Crecimiento en caldo BHI al 15%	+

### 4.2. Determinación de la sensibilidad a oxacilina en *S. aureus* por el método de susceptibilidad a antibióticos Kirby Bauer (método de difusión en disco).

En base al método de difusión en disco (Kirby Bauer) se determinó la sensibilidad a oxacilina a un total de 70 aislamientos de *S. aureus* recuperados del cepario del laboratorio de Bacteriología Intestinal provenientes de infecciones nosocomiales y de portadores asintomáticos.

Quince aislamientos de infecciones nosocomiales fueron resistentes a oxacilina y 14 aislamientos fueron sensibles a dicho antibiótico; en cambio, 11 aislamientos de portadores asintomáticos fueron resistentes y 30 fueron sensibles (Cuadro VIII).

Cuadro VIII. Número de aislamientos MRSA y MSSA de infecciones nosocomiales y de portadores asintomáticos recuperados del HIMFG.				
Origen	Infecciones nosocomiales		Portadores asintomáticos	
Cepa	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA
Número de aislamientos	15	14	11	30
Subtotal	29		41	
Total	70			

En base a la infección, las cepas MSSA y MRSA se distribuyeron conforme a el siguiente cuadro:

Cuadro IX. Distribución de las infecciones nosocomiales originadas por <i>S. aureus</i> en el HIMFG de acuerdo a su sensibilidad a oxacilina.			
INFECCIÓN	MSSA	MRSA	
	# DE AISLAMIENTOS	# DE AISLAMIENTOS	Nº asignado*
Bacteriemia primaria	-	1	4
Bacteriemia relacionada a líneas y terapia intravascular	8	6	5, 6, 7, 8, 9, 10
Bacteriemia secundaria (Infección del sitio de inserción de catéter)	-	1	14
Bacteriemia secundaria (infección de herida quirúrgica superficial)	-	1	2
Bacteriemia secundaria (neumonía)	-	1	3
Infección del sitio de inserción de catéter, túnel o puerto subcutáneo	-	1	11
Infección de sitio de inserción del catéter	-	1	13
Infección de herida quirúrgica superficial	1	1	12
Infección de herida quirúrgica profunda	1	-	-
Infección de vías urinarias	1	-	-
Ventriculitis	-	1	1
Peritonitis no quirúrgica (diálisis)	3	-	-
Mediastinitis	-	1	-
Subtotal	14	15	
Total	29		

\*Los números asignados corresponden a cada patrón PFGE mostrados en las figuras 15 y 16.

---



---

### 4.3. Determinación de los fenotipos por la prueba de doble disco clindamicina-eritromicina de las cepas MSSA y MRSA recuperadas del HIMFG.

En base a la prueba de doble disco eritromicina-clindamicina, se identificó que el fenotipo de resistencia constitutiva (cMLS) estuvo presente en casi todos los aislamientos MRSA de infecciones nosocomiales a excepción de dos de ellos, uno de bacteriemia secundaria (infección del sitio de inserción de catéter) y el otro de una infección del sitio de inserción de catéter, túnel o puerto subcutáneo. Cabe mencionar que el primer aislamiento es consecuente del otro; sin embargo, ambos aislamientos fueron considerados como episodios diferentes. Estos dos aislamientos presentaron el fenotipo M.

La mayoría de los aislamientos MSSA de infecciones nosocomiales no presentaron ninguno de los tres fenotipos a excepción de dos aislamientos, de los cuales, uno aislado de una bacteriemia relacionada a líneas y terapia intravascular presentó el fenotipo inducible, y el otro aislado de una peritonitis no quirúrgica (diálisis), presentó el fenotipo constitutivo (Cuadro X).

Cuadro X. Tipos de fenotipos MLS <sub>B</sub> presentes en cepas MRSA y MSSA de procesos nosocomiales recuperados de pacientes del HIMFG.								
Cepa	MRSA				MSSA			
Fenotipo	Constitutivo	Inducible	M	S/F	Constitutivo	Inducible	M	S/F
Número de aislamientos	13	-	2	-	1	1	-	12
S/F. Sensible a ambos antibióticos.								

En cuanto a las cepas MSSA y MRSA de portadores asintomáticos, se puede observar el mismo patrón de susceptibilidad. En todos los aislamientos MRSA a excepción de uno el cuál no presentó ninguno de los tres fenotipos, fueron constitutivos (cMLS); mientras que ocho aislamientos MSSA presentaron el fenotipo inducible y otros cuatro de ellos el fenotipo constitutivo (Cuadro XI).

Cuadro XI. Tipos de fenotipos MLS <sub>B</sub> presentes en cepas MRSA y MSSA de portadores asintomáticos.								
Cepa	MRSA				MSSA			
Fenotipo	Constitutivo	Inducible	M	S/F	Constitutivo	Inducible	M	S/F
Número de aislamientos	10	-	-	1	4	8	-	18
S/F. Sensible a ambos antibióticos.								

#### 4.4. Identificación del operón *agr* por PCR

El amplicón del operón *agr* que se puede observar en la fig. 12, con un peso molecular aproximado de 1234pb, se identificó como era de esperarse en todos los aislamientos MSSA y MRSA tanto de portadores como de infecciones nosocomiales. Este fragmento de 1234 pb abarca el extremo 3' de *agrB*, todo de *agrD*, y el extremo 5' de *agrC*.<sup>24</sup>

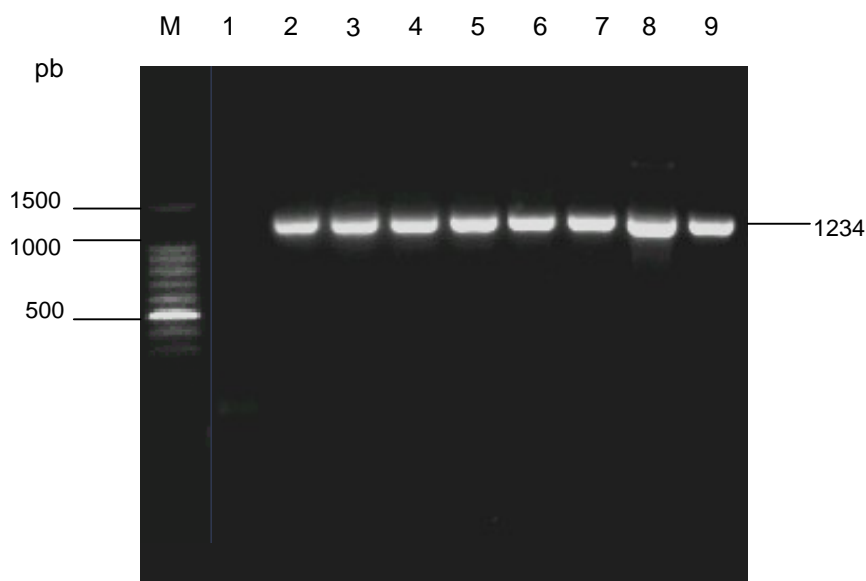


Figura 12. Ensayo de PCR para la identificación del gen *agr* en *S. aureus*. Línea 1, Control de amplificación; Línea 2 a 9, *S. aureus agr* (+); Línea M contiene marcador de peso molecular de 100 pb.



---

---

#### 4.5. Identificación del gen *mecA* y caracterización del *SCCmec* por PCR-múltiple

El gen *mecA* que codifica para la resistencia a penicilina fue detectado por PCR-múltiple en 14 de los 15 aislamientos MRSA recuperados de infecciones nosocomiales y en todos los aislamientos MRSA de portadores asintomáticos, como se puede observar en la fig. 13, al haber obtenido un amplificado de un peso molecular aproximado de 147pb.

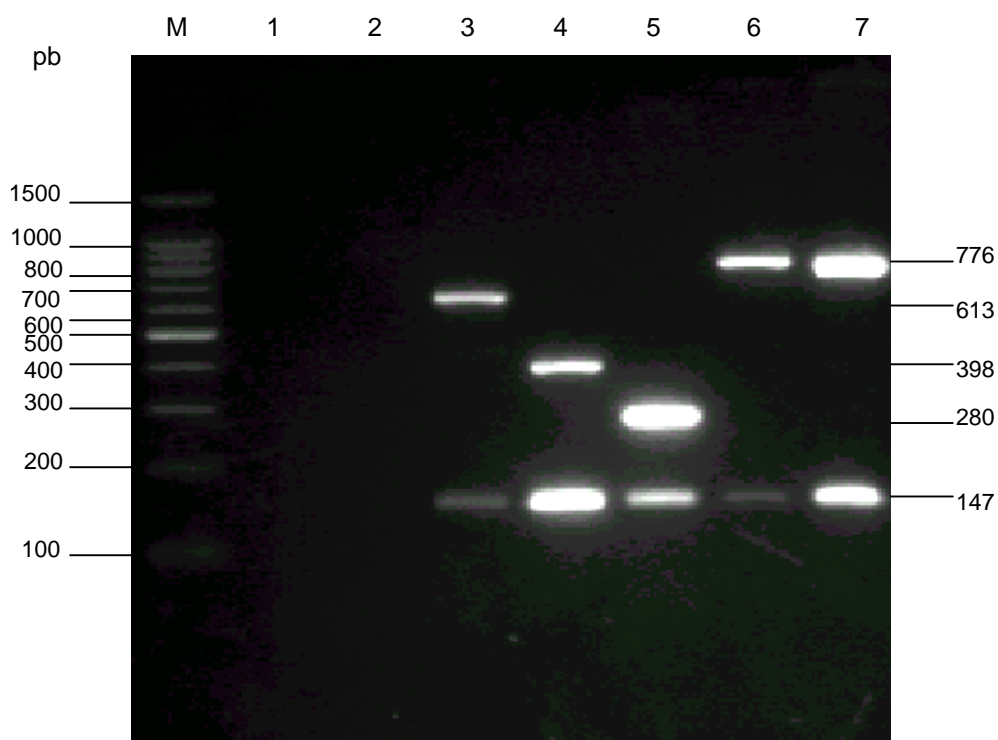


Figura 13. Identificación del gen *mecA* y de tipos y subtipos de *SCCmec* por PCR múltiple en *S. aureus*. Línea 1, Control de amplificación; Línea 2, Control (-) *S. aureus* ATCC 29213; Línea 3, tipo I; Línea 4, tipo II; Línea 5, tipo III; Línea 6 y 7, tipo IVa. Líneas 3 a 7, *mecA* (+). Línea M contiene marcador de peso molecular de 100 pb.

El tipo de *SCCmec* se determinó también por la misma PCR-múltiple en cada uno de los aislamientos en los que se identificó el gen *mecA*, en donde, el *SCCmec* tipo II, mismo que tuvo un tamaño aproximado de 398 pb (fig. 13), fue el predominante, detectándose en 12 aislamientos de infecciones nosocomiales y 10

aislamientos de portadores asintomáticos, los cuáles presentaron el fenotipo constitutivo (cMLS). El elemento *SCCmec* tipo y subtipo IVa que tuvo un tamaño aproximado de 881pb (fig. 13), fue identificado en los dos mismos aislamientos recuperados de infecciones nosocomiales que presentaron el fenotipo M. El elemento *SCCmec* tipo y subtipo IVa también fue identificado en 1 aislamiento recuperado de un portador sano, precisamente aquel que no presento ninguno de los tres fenotipos (Cuadro XII).

Cuadro XII. Número de aislamientos MRSA de infecciones nosocomiales y de portadores asintomáticos que mostraron el gen *mecA* y tipo de *SCCmec* que presento cada uno de ellos.

Origen	<i>mecA</i> (+)	Tipo de <i>SCCmec</i>							
		I	II	III	IVa	IVb	IVc	IVd	V
Infecciones nosocomiales	14	-	12	-	2	-	-	-	-
Portadores asintomáticos	11	-	10	-	1	-	-	-	-

\*Sólo un aislamiento de origen nosocomial no amplificó el gen *mecA*.

#### 4.6. Detección de los genes PVL por PCR

Los amplicones de PVL (*lukS-PV* y *lukF-PV*), los cuáles se pueden observar en la fig. 14, con un peso molecular aproximado de 433 pb, fueron detectados por PCR en dos de los aislamientos MRSA recuperados de infecciones nosocomiales, y en un aislamiento de portador asintomático, mismos que presentaron el elemento *SCCmec* tipo y subtipo IVa.

Los genes PVL se identificaron también en un aislamiento de MSSA proveniente de un portador asintomático, el cuál no presento ninguno de los tres fenotipos de resistencia.

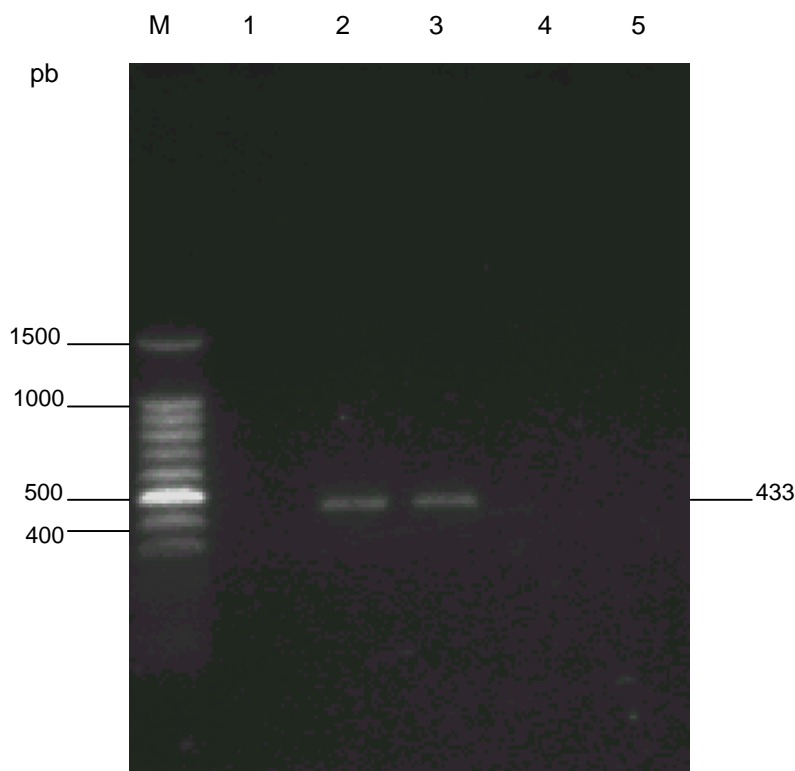


Figura 14. Ensayo de PCR para la identificación de los genes PVL en *S. aureus*. Línea 1, Control de amplificación; Línea 2, Control (+) *S. aureus* ATCC 25923; Línea 3, *S. aureus* PVL (+); Línea 4-5, *S. aureus* PVL (-). Línea M contiene marcador de peso molecular de 100 pb.

#### 4.7. Identificación de la huella genómica de MRSA de procesos nosocomiales y de portadores asintomáticos

Los 14 aislamientos MRSA de infecciones nosocomiales y los 11 aislamientos MRSA de portadores asintomáticos *mecA* (+), fueron distribuidas de acuerdo a los lineamientos de Tenover, *et al.*,<sup>58</sup> en varios tipos y subtipos tomando en cuenta los patrones PFGE. También se realizó un dendograma en base al coeficiente de Dice para ver el porcentaje de similitud de los datos obtenidos por PFGE de estas cepas (Ver fig. 15 y 16).

En base a las figs. 15 y 16, se observa que hay un patrón de restricción común en la mayoría de los aislamientos MRSA de infecciones nosocomiales y de portadores asintomáticos. Este patrón en común fue nombrado como tipo A; 7

---

---

aislamientos nosocomiales y 7 aislamientos de portadores asintomáticos fueron indistinguibles por PFGE de este patrón, representando la misma cepa o cepa brote. Estos aislamientos tuvieron un porcentaje de similitud del 100%.

Hay cinco subtipos de A designados como A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub> y A<sub>5</sub>, y que se distribuyeron de la siguiente manera:

El subtipo A<sub>1</sub>, estuvo representado por tres aislamientos, de los cuáles dos son de infecciones nosocomiales y una de un portador asintomático. Los subtipos A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>, estuvieron representados por uno y dos aislamientos respectivamente, correspondientes a la infecciones nosocomiales; mientras que los subtipos A<sub>4</sub> y A<sub>5</sub>, estuvieron representados cada uno por un aislamiento de un portador asintomático. Todos estos aislamientos incluyendo la cepa brote tipo A, presentaron en común el fenotipo cMLS y el elemento SCC*mec* tipo II. Los subtipos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, y A<sub>4</sub>, son aislamientos en base a Tenover, *et al.*,<sup>58</sup> probablemente relacionadas epidemiológicamente a la cepa brote tipo A, mientras que subtipo A<sub>5</sub>, es un aislamiento posiblemente relacionado epidemiológicamente a la cepa brote.

En base al dendograma, los resultados fueron muy similares:

En infecciones nosocomiales, el subtipo A<sub>1</sub> tuvo un porcentaje de similitud del 95% con respecto a la cepa brote; el subtipo A<sub>2</sub>, tuvo un porcentaje de similitud del 85% con respecto a la cepa brote y al subtipo A<sub>1</sub>; y el subtipo A<sub>3</sub>, tuvo un porcentaje de similitud casi del 85% con respecto a la cepa brote y a los subtipos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>.

Asimismo, en portadores asintomáticos, el subtipo A<sub>1</sub> tuvo un porcentaje de similitud del 95% con respecto a la cepa brote; el subtipo A<sub>4</sub>, tuvo un porcentaje de similitud del 85% con respecto a la cepa brote y el subtipo A<sub>1</sub>; y, el subtipo A<sub>5</sub>, tuvo un porcentaje de similitud del 70% con relación a la cepa brote y a los subtipos A<sub>1</sub> y A<sub>4</sub>.

---

---

También se identificaron otros dos tipos que difieren substancialmente de la cepa brote, y que por lo tanto en base a Tenover, *et al.*,<sup>58</sup> son aislamientos no relacionados. A estos dos aislamientos se les designo por separado como tipo B y tipo C.

El tipo B, consto de dos aislamientos nosocomiales y son aquellos mismos que presentaron el fenotipo M, el *SCCmec* tipo y subtipo IVa, y los genes PVL. Este tipo tuvo un porcentaje bajo de similitud del 65% con respecto a la cepa brote y subtipos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>, provenientes de infecciones nosocomiales.

El tipo C, solamente estuvo representado por un aislamiento de un portador asintomático y que interesantemente pertenece a aquel aislamiento que no mostró ninguno de los tres fenotipos, pero que si presento el elemento *SCCmec* tipo y subtipo IVa y los genes PVL. El tipo C, tuvo un porcentaje de similitud del 80%, con respecto al subtipo A<sub>5</sub> y un 70% de similitud con relación a la cepa brote y subtipos A<sub>1</sub> y A<sub>4</sub>.

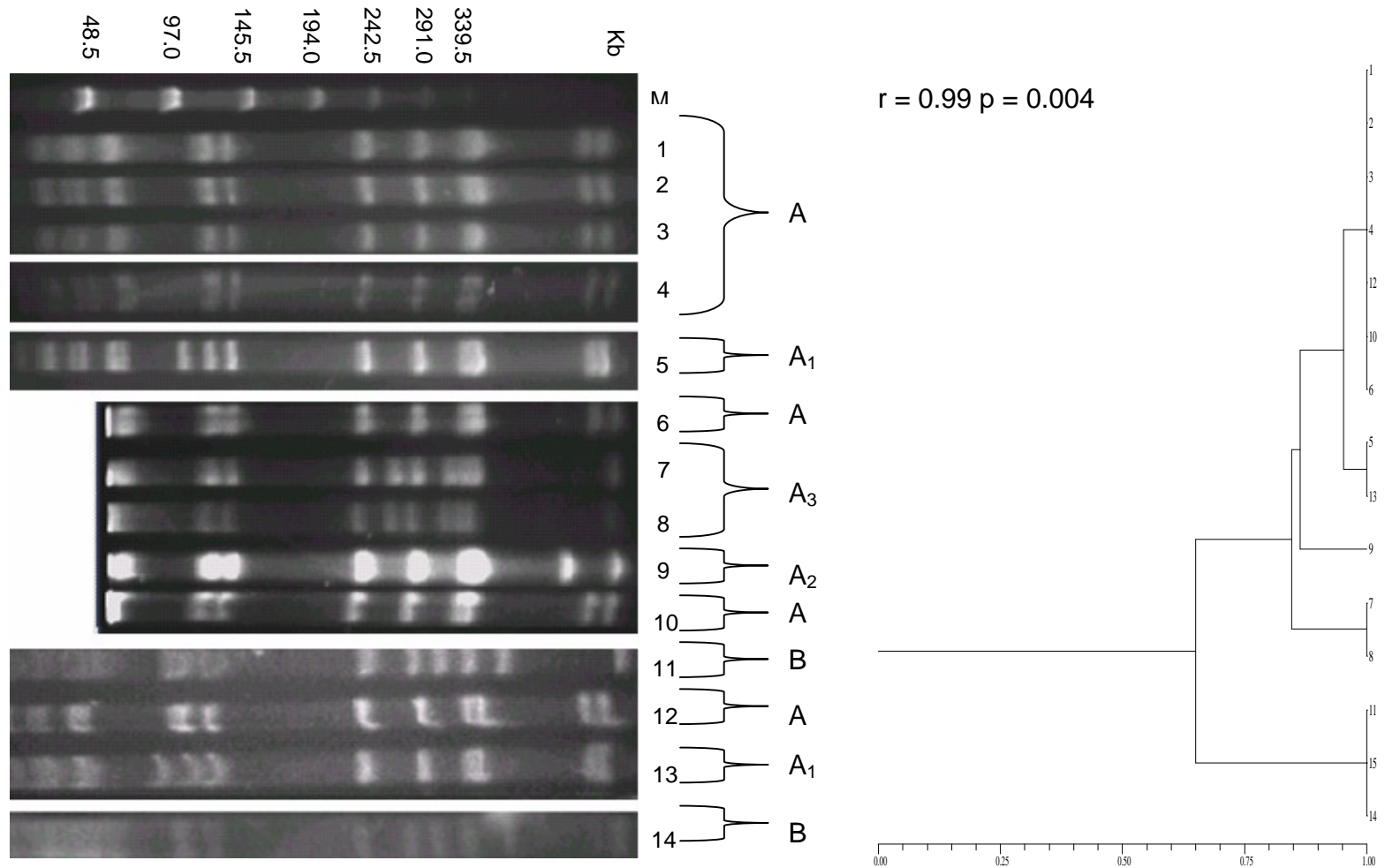


Figura 15. (Izquierda). Patrones PFGE de DNA genómico digerido con *Sma* I de aislamientos MRSA de infecciones nosocomiales mostrando los tipos (A, B) y subtipos (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>) asignados a cada aislamiento. Línea M contiene marcador de peso molecular en kilobases (kb). (Derecha). Dendrograma de los patrones PFGE de los tipos y subtipos obtenidos en este estudio. Números del 1 a 14, representan los números asignados a los aislamientos MRSA de infecciones nosocomiales.

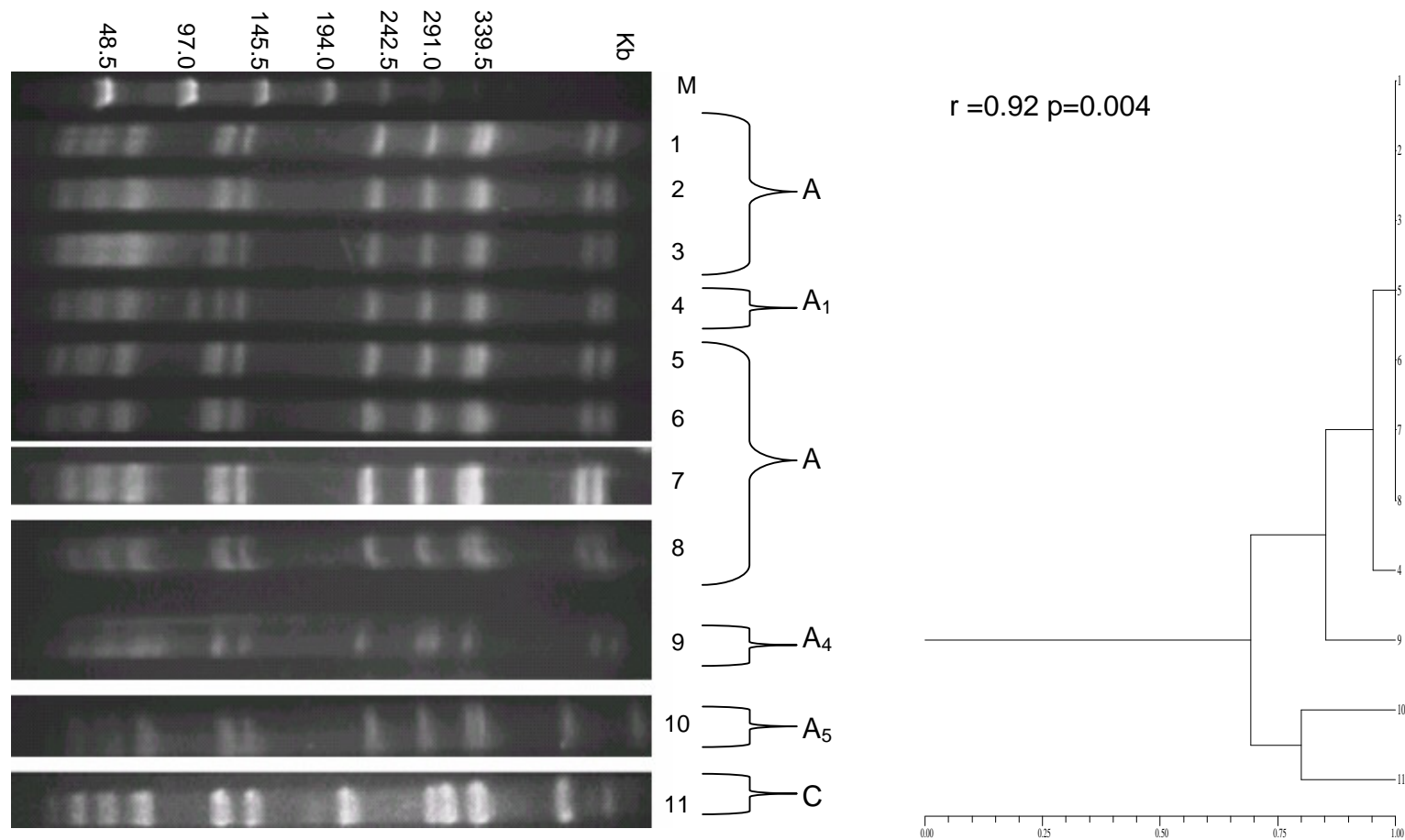


Figura 16. (Izquierda). Patrones PFGE de DNA genómico digerido con *Sma* I de aislamientos MRSA de portadores asintomáticos mostrando los tipos (A, C) y subtipos (A<sub>1</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub>) asignados a cada aislamiento. Línea M contiene marcador de peso molecular en kilobases (kb). (Derecha). Dendograma de los patrones PFGE de los tipos y subtipos obtenidos en este estudio. Números del 1 a 11, representan los números asignados a los aislamientos MRSA de infecciones nosocomiales.

---

---

## 5. DISCUSIÓN

La importancia de *S. aureus* como una de las causas más comunes de infecciones adquiridas en la comunidad y de origen nosocomial, es que resultan en unas elevadas tasas de morbilidad y mortalidad substanciales, por lo que son un problema de salud pública alrededor del mundo.<sup>61,63</sup>

*S. aureus* se encuentra como comensal y patógeno extremadamente versátil en humanos con una compleja patogenicidad que lo hace causante de tres síndromes conocidos: infecciones cutáneas, infecciones profundas y sistémicas, y síndromes toxémicos.<sup>24</sup> *S. aureus* es la principal causa de infecciones adquiridas después de una operación y la segunda causa más frecuente de neumonía nosocomial y bacteriemia.<sup>4</sup> Dentro del Hospital infantil de México “Federico Gómez”, de acuerdo al cuadro IX, se observa una similitud en la presentación de enfermedades por MSSA y MRSA; sin embargo, cabe destacar que del total de los aislamientos de *S. aureus*, cerca del 50% de las bacteriemias, están relacionadas a líneas y terapias intravasculares. Un hospital pediátrico de tercer nivel en México, registró un amplio predominio de *S. aureus* relacionado con bacteriemias nosocomiales.<sup>4,61</sup> El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”, encontró que *S. aureus* es el segundo microorganismo aislado en infecciones de heridas quirúrgicas y también es responsable de bacteriemias primarias.<sup>4</sup> En un hospital oncológico de México de tercer nivel (1998-2003), *S. aureus* se aisló en 8.9% del total de los cultivos de sangre -cuarto microorganismo más frecuentemente identificado.<sup>6</sup>

El éxito en la colonización y producción de enfermedades por esta bacteria es en gran parte a la expresión de los factores de virulencia, los cuales promueven la adhesión, adquisición de nutrientes, y evasión de la respuesta inmunológica de el hospedero y que en su mayoría son regulados por el sistema quórum-sensing *agr*.<sup>62</sup> El operón *agr*, el cuál históricamente se le ha asignado un papel central como modelo en la patogénesis de *S. aureus*, se encontró como era de esperarse, en todas las cepas MSSA y MRSA nosocomiales y de portadores asintomáticos.



---

---

La literatura sugiere que el papel del quórum-sensing en infecciones estafilocócicas puede no ser siempre obvia inmediatamente, puesto que esto varía con el tipo de infección, ambiente del hospedero, e incluso con el tiempo. De esta manera, se ha encontrado que la expresión de *agr* contribuye a la patogénesis estafilocócica en varios modelos infecciosos, incluyendo abscesos subcutáneos de murina y artritis, así como también en endocarditis en conejos. Sin embargo, el papel potencial del quórum-sensing mediado por *agr* no es tan claro en otros hospederos. Investigadores han manifestado a través de estudios *in vivo* en humanos y animales, que *agr* en ciertas infecciones, aparece ser innecesario en la expresión de factores de virulencia secretados. En otros modelos en el cuál *agr* no aparece influenciar fuertemente la virulencia, su expresión (o carencia de eso) puede contribuir a la formación de un biofilm. Inversamente, en modelos en el cuál la expresión de *agr* no aparece a afectar la formación del biofilm, este puede aun regular la producción de los factores de virulencia, lo cuál hace que el desarrollo de modelos relevantes *in vitro* e *in vivo* sean un asunto desafiante. Conjuntamente, estos estudios sugieren que se hallan mecanismos reguladores adicionales que son integrales en la regulación de la respuesta quórum y la total virulencia del estafilococo.<sup>65</sup>

Estudio realizado para la identificación del grupo *agr* dentro de una población de aislamientos de *S. aureus* colonizadores de niños y del personal que los atiende, todos los aislamientos pudieron ser asignados a uno de los tres grupos mayores obteniendo una similar prevalencia, indiferente de si los aislamientos estuvieron implicados en la transmisión de *S. aureus* dentro de las familias. En este estudio, se encontró que entre los portadores saludables, los grupos *agr* I, II y III aparecen ajustarse igualmente, lo cuál puede reflejar la selección para la coexistencia de cepas de *S. aureus* en una población; sin embargo, sus conclusiones pueden no aplicar cuando consideran hacer frente poblaciones con diferentes contrastes ecológicas (tales como el transporte de cepas adquiridas en el hospital o cepas meticilino resistentes), o aislamientos del grupo *agr* IV.<sup>52</sup> Recientemente, cepas con genotipo *agr* grupo III fueron representadas por cepas CA-MRSA provenientes de infecciones, mientras que cepas MRSA aisladas del nosocomio en los EUA

---

---

fueron predominantemente del grupo *agr* II.<sup>50</sup> En este trabajo no se agruparon los aislamientos; sin embargo, deberá considerarse en estudios posteriores.

Dado el número y severidad de las infecciones estafilocócicas, es importante entender la naturaleza y la patogénesis de las infecciones; sin embargo, existen otros factores que contribuyen a la patogenicidad de *S. aureus*, como es la resistencia a los antibióticos.

El fenotipo que se ha visto asociado más frecuente con la persistencia de cepas de *S. aureus* en el hospital es el de resistencia a metilicina.<sup>61</sup> La mayoría de nuestros aislamientos oxacilina resistentes nosocomiales y de portadores asintomáticos, a excepción de uno, la resistencia fue mediada por el gen *mecA*, el cual fue identificado por PCR, sugiriendo efectivamente el mecanismo clásico idéntico para la resistencia a metilicina entre los aislamientos. Una posible explicación al aislamiento que fue resistente a oxacilina y no presentó el gen *mecA*, es porque haya presentado un fenómeno de tolerancia a este antibiótico.

A excepción de dos aislamientos MRSA nosocomiales y uno de un portador asintomático, todos los demás fueron resistentes a eritromicina y clindamicina, presentando el fenotipo cMLS, lo cual significa, que la metilación del ribosoma se produce continuamente, impidiendo la unión del antibiótico y, por tanto, su acción.

En cuanto corresponde a los otros dos aislamientos MRSA nosocomiales, estos fueron resistentes a eritromicina; sin embargo, no se evidenció el fenotipo inducible de resistencia para clindamicina, por lo que es posible que el mecanismo de acción de resistencia a eritromicina sea mediado por *msrA*.

La gran mayoría de los MRSA no sólo son resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos, como se pudo observar en nuestros aislamientos, sino que también son resistentes a múltiples antibióticos de familia o clase distinta.<sup>61</sup>

La multirresistencia es un factor que influye en la persistencia de MRSA dentro del ámbito hospitalario,<sup>61</sup> y complica también el tratamiento de las infecciones intravasculares y otras infecciones causadas por este microorganismo, las cuáles, ambas infecciones, nosocomiales y adquiridas en la comunidad, han ido aumentando proporcionalmente.<sup>50</sup> La multirresistencia esta definida de acuerdo a McDougal *et al.*,<sup>39</sup> como la resistencia a tres o más clases de agentes antimicrobianos. Así, nuestros aislamientos MRSA asociados a infecciones nosocomiales y portadores asintomáticos resistentes a eritromicina y clindamicina (fenotipo constitutivo), son multirresistentes, ya que son resistentes a tres clases de antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, macrólidos y lincosamidas) y además presentan el elemento SCCmec tipo II, el cuál contiene múltiples determinantes de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos y son responsables de el fenotipo de multirresistencia comúnmente encontrado en aislamientos MRSA nosocomiales. La mayoría de estos aislamientos presentaron en común un perfil electroforético, permitiéndonos establecer entre ellos una cepa brote designada como tipo A. El patrón PFGE de la cepa MRSA tipo A, es muy similar al tipo de campo pulsado (“pulsed field types” PFTs) USA 100, reportado por McDougal *et al.*,<sup>39</sup> (Ver fig. 17), el cual entre los cinco PFTs asociados predominantemente con infecciones relacionadas a los centros de salud (USA 100, -200, -500, -600, y -800), fue por hecho el más común, representando el 44% de todos los aislamientos MRSA de EUA examinados. Los aislamientos USA 100, cuyo PFT fue previamente designado como la clona New

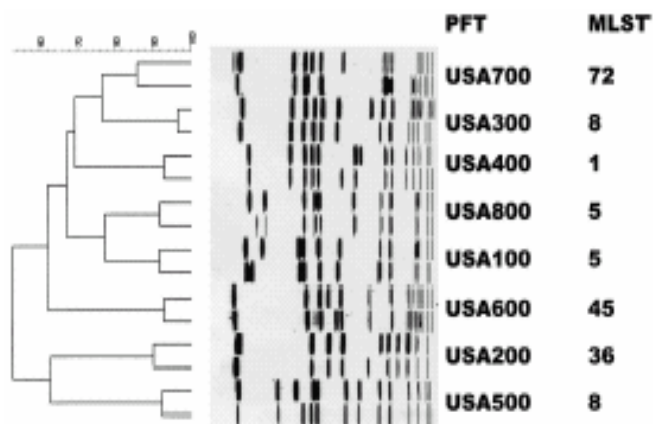


Figura 17. Dendrograma de PFTs con tipo de cepa (patrón más frecuente) y una cepa variante. También se muestra el MLST correspondiente para cada PFT.

York/Japan, fueron usualmente resistentes a espectinomicina (consistente con el SCCmec II) y multirresistentes a agentes comúnmente usados terapéuticamente. Todos estos aislamientos fueron resistentes a eritromicina: 72% fueron constitutivamente resistentes a clindamicina, y 28% mostraron

---

---

resistencia inducible a clindamicina,<sup>39</sup> fenotipo del cuál ninguno de nuestros aislamientos MRSA presento.

En México, son muy escasos los reportes que documentan la clonalidad de los aislamientos MRSA; sin embargo, en un estudio llevado a cabo durante un período de siete años (1997 a 2003) en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, determinaron que la clona internacional multirresistente Nueva York/Japón fue introducida en el hospital en 2001, reemplazando completamente la clona M por el 2002 (MRSA no multirresistente, *SCCmec* tipo IV, PVL negativo), la cuál estuvo presente en un hospital pediátrico en la Ciudad de México, entre 1997 y 2000.<sup>62</sup> En base a estos resultados y los obtenidos por nosotros, podemos reconocer que la clona USA 100, sin duda, aún predomina en los aislamientos MRSA al menos en estos dos hospitales pediátricos de tercer nivel de la Ciudad de México y puede ser posible que esta clona pudo haber sido transferida de los EUA a México, por la cercanía entre ambos países.

Entre los aislamientos nosocomiales MRSA obtenidos en el HIMFG, podemos observar que dos de ellos no están relacionados epidemiológicamente a nuestra cepa brote. Estos aislamientos designados como tipo B, aparte de mostrar un perfil PFGE distinto a la cepa brote y sus subtipos, también presentaron características diferentes en cuanto al fenotipo y el tipo de *SCCmec*, siendo fenotipo M y *SCCmec* tipo IVa, además de llevar los genes PVL. En base a estas características y al perfil PFGE, la cepa tipo B es muy similar a algunas de la clonas USA 300 adquiridas en la comunidad, reportadas por McDougal *et al.*,<sup>39</sup> (ver fig. 17), y recientemente, por Tenover *et al.*,<sup>57</sup> (Ver fig. 18). Los aislamientos USA 300 reportados por McDougal, llevaron el *SCCmec* IV (no reporta el subtipo), fueron resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y a eritromicina, y fueron predominantemente de infecciones de la piel de inicio en la comunidad. Cabe mencionar que el 85% de los aislamientos eritromicina resistente fueron susceptibles a clindamicina y no fueron inducidos con eritromicina (probablemente debido a *msrA*),<sup>39</sup> tal y como nuestros dos aislamientos. De manera similar, la cepa USA 300 que ha sido aislada de pacientes residiendo en diversas regiones

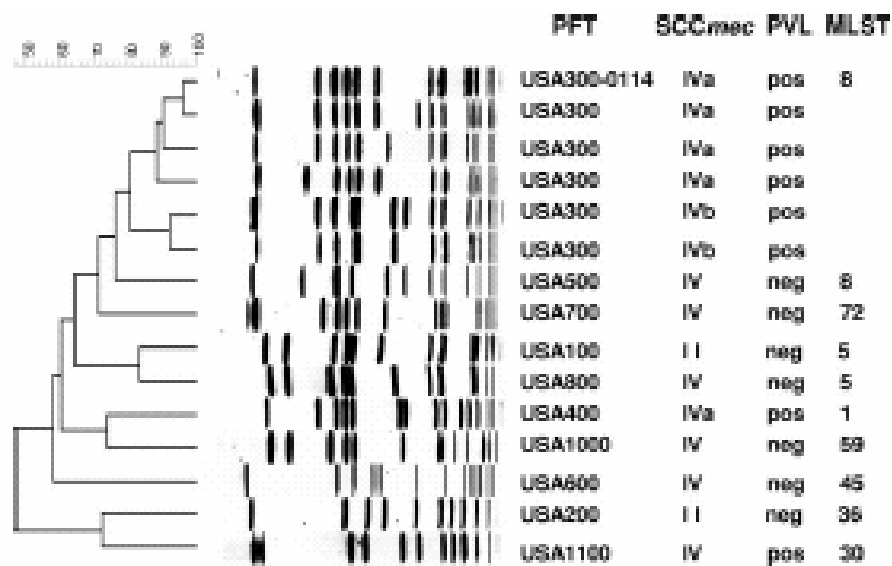


Figura 18. Perfiles PFGE de patrones de macrorestricción con *SmaI* de aislamientos de *S. aureus* de varios tipos USA. PFTs, tipos de SCC<sub>mec</sub>, resultados de la PCR para los genes PVL (pos, positivo; neg, negativo), y tipos de secuencia determinados por MLST son mostrados.

geográficas de los EUA y designada como USA 300-0114 y descritos por Tenover *et al.*,<sup>57</sup> y que también son una mayor causa de infecciones en piel y tejidos blandos entre las personas que habitan en diferentes sitios en la comunidad (incluyendo centros de cuidado e instalaciones correccionales, y entre equipos deportivos, americanos nativos, homosexuales, reclutas militares), son típicamente resistentes a penicilina, oxacilina, y eritromicina (el último también mediado por *msrA*); sin embargo, reporta que marcadores de resistencia intervenidos por plásmidos, tales como la resistencia a tetraciclina y clindamicina, mediadas por *tet(K)* y *ermC*, respectivamente, están comenzando a aparecer y varios aislamientos han disminuido la susceptibilidad a fluoroquinolonas. Estas clonas portan el SCC<sub>mec</sub> tipo IVa, además de abordar los genes que codifican para la leucocidina Pantón-Valentine.

Existen muy pocos reportes acerca de la presencia de la clona USA 300 dentro de los hospitales. Huang *et al.*,<sup>23</sup> mostró en un estudio, que el 33% de los aislamientos HA-MRSA tipificados por PFGE fueron USA 300, explicando dos posibles razones para estos resultados. Primero, el organismo pudo haber sido

---

---

actualmente transmitido nosocomialmente. Esta hipótesis es respaldada al encontrar aislamientos USA 300 en el grupo HA exhibiendo un patrón de susceptibilidad antimicrobiana intermedia entre esos de tipos CA USA 300 y los HA no USA 300. Estas conclusiones aumentan la preocupación que las cepas CA y HA pueden intercambiar material genético, resultando en un organismo adaptado únicamente para producir cepas agresivas CA-MRSA en infecciones en piel y tejido blando, las cuáles llevan el gen PVL y que poseen resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, como las cepas HA actuales. Alternativamente, el organismo estuvo colonizando al paciente en admisión, pero fue identificado en mas de 48 horas después de la admisión. Asimismo existe la posibilidad de que dos de nuestros aislamientos también hayan sido identificados erróneamente.

El encontrar aislamientos nosocomiales con características similares a las cepas CA-MRSA, hace pensar que en un futuro no solamente aumenten las cepas CA-MRSA en la comunidad, sino que estas cepas migren y se acrecienten en el hospital, puesto que poseen mayor rapidez de duplicación celular y una alta capacidad de diseminación,<sup>4</sup> y en relación, nuestros resultados y los de otros estudios,<sup>10,23</sup> proporcionan evidencia de que esto ya esta pasando.

Del mismo modo que los aislamientos MRSA hallados dentro del HIMFG, podemos observar que los aislamientos MRSA correspondientes a los portadores asintomáticos, la mayoría presenta en común un patrón PFGE indistinguible con respecto a los aislamientos nosocomiales, por lo que también están representados por la misma cepa denominada tipo A, además de mostrar el mismo fenotipo de resistencia a eritromicina y clindamicina (fenotipo cMLS) y el SCC*mec* tipo II. Del total de estos aislamientos, solamente uno no mostró las mismas características fenotípicas y genotípicas, puesto que fue sensible a ambos antibióticos y presento el SCC*mec* tipo IVa, los genes PVL y diferente perfil electroforético. Sin embargo, es posible que este aislamiento designado como cepa tipo C y que no esta relacionado epidemiológicamente a la cepa brote (tipo A), pertenezca a algunas de las dos clonas comunitarias USA 300 y USA 400.

---

---

Un estudio preeliminar nacional realizado recientemente en EUA por la CDC, para determinar la prevalencia y colonización de *S. aureus* y cepas MRSA en la población, encontraron al igual que nosotros, que de las cepas MRSA analizadas, todas presentaron el gen *SCCmec* tipo II o IV (50.7 y 49.3%, respectivamente). Todas las cepas que presentaron el gen PVL tenían el gen *SCCmec* IV. La clona encontrada más comúnmente fue la USA 100 y sólo se encontraron 6 cepas de la clona USA 300,<sup>4</sup> lo cuál nos muestra nuevamente que por nuestra cercanía con EUA, estas clonas estén circulando también aquí en México.

Estos resultados también manifiestan que es posible que la distinción entre cepas HA-MRSA y CA-MRSA se convierta en un problema más difícil, debido a que por lo visto, las cepas HA-MRSA ya se mueven en la comunidad y las cepas CA-MRSA en el hospital.<sup>9</sup> Por lo tanto se deben establecer las estrategias más efectivas y las medidas adecuadas para entender y controlar la cambiante epidemiología y sintomatología clínica y así prevenir que emerjan y se dispersen en ambos ámbitos, ya que puede convertirse en un importante problema de salud en un futuro cercano.<sup>4</sup>

El encontrar una cepa en común con el mismo perfil de susceptibilidad antimicrobiana y el mismo patrón electroforético provenientes de infecciones nosocomiales y portadores asintomáticos, sin duda hace pensar que el estado de portador juega un papel muy importante en la transmisión de *S. aureus*, siendo un factor de riesgo importante en la infección por este microorganismo, tanto en la comunidad como en los hospitales. Esto ha sido estudiado ampliamente en pacientes quirúrgicos, en pacientes bajo hemodiálisis y en pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria continua ("Continuous ambulatory peritoneal diálisis", CAPD).<sup>4,30</sup> También reportes sobre dispositivos intravasculares relacionados a bacteriemia, bacteriemias por *S. aureus* en pacientes HIV-positivos y pacientes con granulomatosis de Wegener's con un alto grado de recaída, han sido publicados.<sup>30</sup>

---

---

Aunque los pacientes hospitalizados constituyen el reservorio fundamental con altas tasas de prevalencia,<sup>34,63</sup> el personal asistencial colonizado por cepas MRSA se puede convertir en fuente importante de infección para los pacientes más susceptibles y, en especial, para los que permanecen en la unidad de terapia intensiva. Un estudio realizado en la unidad de terapia intensiva de la Clínica Universitaria Bolivariana de Medellín, determinó la prevalencia de aislamientos MRSA en los trabajadores (asistenciales y no asistenciales) y la prevalencia de *S. aureus* en fosas nasales y faringe en la misma población. La región anatómica en la que se obtuvo el mayor número de aislamientos correspondió a las fosas nasales, tal y como se reporta en la literatura. La prevalencia de MRSA se encontró entre lo reportado (0.8% a 20%), y aunque fue baja, sugieren que los trabajadores asistenciales son una importante fuente de transmisión de *S. aureus*, ya sea de origen propio, actuando la persona como reservorio, o adquirido por contacto con un paciente infectado o material contaminado, pudiendo desencadenar brotes epidémicos.<sup>34</sup>

Es probable que algunos de nuestros aislamientos obtenidos en el nosocomio, por el hecho de presentar las mismas características fenotípicas y genotípicas y de acuerdo a los lineamientos de Tenover *et al.*,<sup>58</sup> parecen ser parte de un mismo brote, y posiblemente pudieran haber sido transmitidos por trabajadores de la salud (asistencial y no asistencial), ya que como se dijo precedentemente, estos suelen adquirir al *S. aureus* por contacto con un paciente infectado o material contaminado, manteniendo así esta cepa dentro del hospital.

También es posible que puedan haber sido de origen endógeno, principalmente la cepa tipo B, que incluye a dos aislamientos, uno de una infección del sitio de inserción de catéter, túnel o puerto subcutáneo y el otro de una bacteriemia secundaria (infección del sitio de inserción de catéter) que es consecuencia del primero. Un estudio realizado por Von Eiff C *et al.*,<sup>63</sup> investigaron la correlación entre aislamientos de *S. aureus* de las fosas nasales y aislamientos de *S. aureus* de sangre con la ayuda de la electroforesis por campo pulsado, y encontraron que una proporción substancial de casos de bacteriemia por *S. aureus* parece ser de



---

---

origen endógeno desde que ellos se produjeron de colonias en la mucosa nasal. También cabe mencionar que el transporte de *S. aureus* fue un factor de riesgo para el desarrollo de bacteriemia nosocomial durante un brote de MRSA en una unidad de cuidado intensivo, con una proporción de bacteriemia del 38% para portadores de cepas MRSA, 9.5% para portadores de cepas susceptibles, y 1.7% para no portadores. Otro estudio también reportó que el 45% de los pacientes que se estudiaron, fueron portadores nasales antes de que los catéteres fueran insertados.<sup>63</sup> La relación entre nuestros aislamientos de origen nosocomial y el transporte de *S. aureus*, no nos fue permisible determinarlo, ya que comúnmente *S. aureus* no se aísla a partir de exudados nasofaríngeos en pacientes dentro del hospital y por lo tanto no se cuentan con estos aislamientos.

Varios estudios han mostrado que la eliminación del transporte nasal de *S. aureus*, reduce la incidencia de infecciones por este microorganismo y en muchos casos el organismo también desaparece de otras áreas del cuerpo.<sup>30,63</sup> Estos resultados sugieren que la adquisición y transmisión de *S. aureus* resistente a antibióticos principalmente en el hospital, es de preocupación entre portadores intermitentes y persistentes tratados con antibióticos.<sup>30</sup> Londoño *et al.*,<sup>34</sup> recomienda por medio de cultivos de los portadores entre los trabajadores de la salud, siempre y cuando, las investigaciones epidemiológicas lo sugieran, vigilar e identificar de entre los tres portadores de MRSA, quién lo es de forma permanente, para así implementar medidas de control (eliminación de portación con mupirocina y tratamiento antihistamínico a portadores con rinitis alérgica, junto con el uso de bata y mascarilla, además de una higiene rigurosa de manos y superficies, control de contactos, descubrimiento de portadores, control de la difusión aérea y por fómites, y búsqueda de la fuente de infección) con el fin de evitar la diseminación de MRSA en la unidad de terapia intensiva y, así, en la clínica. El control de infecciones en los hospitales debe jugar un papel importante. Las estrategias en la comunidad pueden también enfatizar la detección oportuna, el tratamiento adecuado de las infecciones y la optimización de las medidas básicas de higiene. La aparición de cepas CA-MRSA aumenta esta necesidad.<sup>4</sup>

---

---

Complementario a esto, un estudio realizado en una casa de enfermeras en Alemania para determinar la prevalencia y factores de riesgo para el transporte de PVL-MRSA en residentes y personal, explican que a pesar de la relativamente alta proporción de colonización entre los residentes y que ninguno de ellos desarrollo infecciones relacionadas a PVL-MRSA durante el período de estudio, e incluso en la ausencia de manifestaciones clínicas, no obstante, el transporte nasal de PVL-MRSA puede ser asumido a ser un mayor factor de riesgo para la subsiguiente infección invasiva y transmisión de cepas MRSA. En este estudio, ellos sugieren que el estado de portador de PVL-MRSA entre los residentes fue asociado con factores de riesgo (desorden cerebral circulatorio, bajo índice de masa corporal, estado de movilidad postrado en cama, locación de comodidad) reflejando su dependencia con el cuidado de las enfermeras ya que la transmisión cruzada entre residentes puede ocurrir vía manos contaminadas o la ropa del personal de enfermería.<sup>47</sup>

La importancia de PVL como un factor potencial de virulencia y el hecho de que ahora son reconocidos cada vez más en hospitales, además de que se encuentran en una alta proporción en cepas CA-MRSA, permitió a nosotros investigar la presencia de PVL en aislamientos MSSA y MRSA de portadores asintomáticos y de infecciones nosocomiales.

En un estudio realizado por Lina *et al.*,<sup>33</sup> detectaron los genes PVL en 93% de las cepas asociadas con furunculosis y en 85% de esos asociados con neumonía hemorrágica necrótica severa (todos adquiridos en la comunidad). Ellos también fueron detectados en 55% de cepas de celulitis, 50% de cepas de abscesos cutáneos, 23% de cepas de osteomielitis, y 13% de cepas de infecciones de finger-pulp. Los genes PVL no fueron detectados en cepas responsables para otras infecciones, tales como endocarditis infectiva, mediastinitis, neumonía adquirida en el hospital, infección en el tracto urinario, y enterocolitis, o en esos asociados con síndrome de choque tóxico. Así, al parecer PVL esta principalmente asociado con lesiones necróticas envolviendo la piel o mucosa. Diep *et al.*,<sup>10</sup> en

---

---

otro estudio, también asocio a la mayoría de las cepas MRSA PVL positivos, con infecciones en piel y tejido blando.

Entre nuestros aislamientos de infecciones nosocomiales, PVL no se detectó en ningún aislamiento MSSA; sin embargo, si fue detectado en dos aislamientos MRSA. Era de esperarse la baja presencia de PVL entre estos aislamientos ya que son muy pocas las cepas HA-MRSA que la producen. Sin embargo, para nuestra sorpresa, lo que no se esperaba es que estos aislamientos presentaran características semejantes a los CA-MRSA, y más aún, que uno de ellos fuera proveniente de una bacteriemia secundaria consecuente del otro aislamiento. Existen muy pocos reportes de la presencia de PVL en bacteriemias de origen nosocomial e incluso Lina *et al.*,<sup>33</sup> en su estudio, no encontró una asociación con cualquier cepa de *S. aureus* PVL positivo con casos secundarios a diseminación hematológica de otros focos tales como un dispositivo intravenoso intravascular. En otro estudio, Couppié *et al.*,<sup>7</sup> detectó PVL en sólo un aislamiento de 86 cepas de *S. aureus* aisladas de sangre, aunque no dio más detalle de este aislamiento.

En contraste con los aislamientos nosocomiales, se esperaba que PVL tuviera más presencia entre los portadores, ya que PVL se ha encontrado en una alta proporción en cepas asociadas a la comunidad; no obstante, PVL se encontró en un aislamiento MSSA y en un aislamiento MRSA, el cuál este último como ya se dijo anteriormente, parece tener las características de las cepas CA-MRSA, ya que todos los demás aislamientos MRSA presentaron características fenotípicas y genotípicas similares a las del nosocomio.

Dada la alta morbilidad y mortalidad asociadas con cepas estafilocócicas que llevan los genes PVL,<sup>67</sup> en este aspecto es un punto más a favor para tomar medidas de control dentro de los hospitales con respecto a la detección de portadores dentro del hospital, una vez que los residentes colonizados sean detectados.

Por último, a diferencia de las cepas MRSA resistentes a eritromicina y clindamicina (fenotipo cMLS), los aislamientos MSSA nosocomiales y de

---

---

portadores asintomáticos, en su mayoría fueron sensibles a ambos antibióticos; sin embargo, en algunos casos también se presentó el fenotipo de resistencia iMLS además del cMLS, por lo que se sugiere también que en estos aislamientos se determine la prueba de doble disco.

Para cepas eritromicina resistentes, las pruebas de inducción pueden ayudar a los laboratorios a determinar si los resultados para clindamicina deben ser reportados como susceptibles (cuando la inducción de la prueba es negativa) o como resistente (cuando la prueba de inducción es positiva).<sup>54</sup> Además de que una prueba positiva D señala que el fracaso del tratamiento puede resultar si la clindamicina (importante en el manejo de infecciones estafilocócicas) es usada.<sup>9</sup>

Kaplan,<sup>28</sup> propone que para evitar demora en seleccionar el agente más apropiado para el manejo de las infecciones estafilocócicas, los aislamientos deberían ser probados rutinariamente para el fenotipo inducible MLS<sub>B</sub> usando los métodos aprobados por la CLSI, aunque esto requiera un paso adicional y más costo para esos laboratorios que usan métodos de susceptibilidad antimicrobiana automatizados. Esto es porque las fallas en el tratamiento con clindamicina han sido reportadas para infecciones causadas por aislamientos MRSA con el fenotipo inducible MLS<sub>B</sub> (D-test positivo), y aunque muy pocos aislamientos MSSA lo presentan, reiteramos el uso de esta prueba también en ellos.

---

---

## 6. CONCLUSIONES

- El fenotipo de resistencia que más se observó en *S. aureus* dentro del hospital, fue la resistencia a meticilina, es así que cerca del 50% de los aislamientos de *S. aureus* de origen nosocomial aislados durante un año dentro del HIMFG fueron oxacilina resistentes.
- Los aislamientos MRSA de portadores asintomáticos y de infecciones nosocomiales, a excepción de uno, presentaron el gen *mecA*, sugiriendo que tienen el mismo mecanismo clásico e idéntico para la resistencia a meticilina.
- Se observó una similitud en la presentación de enfermedades por MSSA y MRSA dentro del HIMFG, destacando que cerca del 50% del total de los aislamientos de *S. aureus*, son bacteriemias que están relacionadas a líneas y terapias intravasculares.
- El fenotipo de resistencia a eritromicina y clindamicina en los aislamientos MRSA que más predominó en el HIMFG durante el 2006 fue el cMLS, así como también en los aislamientos MRSA de portadores asintomáticos.
- Se debe de tener en cuenta que una prueba positiva D señala que el fracaso del tratamiento puede resultar si la clindamicina es usada, por lo que se recomienda utilizar la prueba de doble disco, principalmente en aislamientos MSSA.
- El tipo de SCC*mec* que prevaleció entre los aislamientos MRSA del HIMFG y los aislamientos MRSA de portadores asintomáticos fue el SCC*mec* tipo II.
- Se encontró por PFGE el predominio de una cepa MRSA dentro del HIMFG, pues siete aislamientos MRSA mostraron un perfil electroforético indistinguible y un coeficiente de Dice del 100% de similitud, aparte del fenotipo cMLS y el SCC*mec* tipo II.
- La cepa predominante designada como tipo A, fue similar a la clona USA 100, sugiriendo que la migración ha sido un factor importante para que estas clonas se encuentren circulando también aquí en México.
- Se observó también por PFGE el predominio de una cepa MRSA entre los portadores asintomáticos, las cuáles presentaron interesantemente las mismas

---

---

características fenotípicas y genotípicas a la cepa MRSA nosocomial predominante.

- La prevalencia de una misma cepa MRSA en infecciones nosocomiales y en portadores asintomáticos, obliga a conocer el estado de portación de los pacientes y especialmente en los trabajadores de la salud, ya que estos han sido identificados frecuentemente como la fuente de brotes.
- El conocer el estado de portación de un paciente o un trabajador de la salud, puede ayudar también en la toma de medidas de control para evitar la diseminación y permanencia de los microorganismos dentro del hospital.
- Se observó una asociación en este estudio entre el fenotipo de resistencia a eritromicina-clindamicina y el *SCCmec*, en donde el fenotipo cMLS correspondió al *SCCmec* tipo II y el fenotipo M al *SCCmec* tipo IV, sugiriendo que la prueba de doble disco nos puede orientar al tipo de *SCCmec*, aunque no en absoluto.
- Aunque el fenotipo que más predomina entre los aislamientos MRSA dentro del hospital es el cMLS, se recomienda de todas maneras la realización de la prueba de doble disco en aislamientos MRSA, ya que como se dijo anteriormente, el fenotipo M o el fenotipo sensible a ambos antibióticos eritromicina y clindamicina, orienta al *SCCmec* tipo IV el cual predomina entre las cepas de tipo comunitario.
- Se recomienda la detección de los genes PVL en cepas MRSA con fenotipo M y *SCCmec* tipo IV, ya que en conjunto éstos son característicos de las cepas CA-MRSA USA 300 y USA 400 que actualmente están en aumento dentro de la comunidad y que se han reportado también dentro del ambiente hospitalario.
- Los genes PVL se encontraron en muy pocos aislamientos de origen nosocomial, tal y como se reporta en la literatura; sin embargo, estos genes no prevalecieron entre los aislamientos de portadores asintomáticos como se esperaba en un principio.
- Por último, se detectó el operón *agr* como era de esperarse en todas las cepas MSSA y MRSA analizadas en este estudio; sin embargo, se sugiere realizar

---

---

más estudios *in vivo* e *in vitro* de este gen, para un mejor entendimiento en su participación en la patogénesis de este microorganismo.

---

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS

1. Álvarez Manriquez, C.I., S.E. Mendoza Elvira. 1994. Manual Básico de Bacteriología. 1a. edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. pp 77-78, 82-83, 103-105.
2. Borraz, Carmen. 2006. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis Doctoral. Facultad de medicina, Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
3. Brooks, G.F., J.S. Butel, S.A. Moise. 2005. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18ª ed. Traducida de la 23ª edición en inglés. El Manual Moderno. pp 220-222.
4. Bustos-Martínez, J.A., A. Hamdan-Partida, M. Gutiérrez-Cárdenas. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed. **17**:287-305.
5. Calderón-Jaimes, E., L.E. Espinosa de los Monteros, R. Avila-Beltrán. 2002. Epidemiology of drug resistance: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci infections. Salud Publica Mex. **44**:108-112.
6. Cornejo-Juárez, P., C. Velásquez-Acosta, A. Díaz-González, P. Volkow-Fernández. 2005. Tendencia del perfil de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de sangre en un hospital oncológico (1998-2003). Salud Publica Mex. **47**:288-293.
7. Couppié, P., B. Cribier, G. Prevost, E. Grosshans, Y, Piémont. 1994. Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections : an epidemiologic study. Arch Dermatol. **130**:1208-1209.
8. Couto, I., et al. 1996. Ubiquitous presence of a mecA homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. Microb. Drug Resist. **2**:377-391.
9. Crawford, S.E., and R.S. Daum. 2005. Epidemic Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Pediatr Infect Dis J. **24**:459-460.



- 
- 
10. Diep, B.A., G.F. Sensabaugh, N.S. Somboona, H.A. Carleton, and F. Perdreau-Remington. 2004. Widespread Skin and Soft-Tissue Infections Due to Two Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Harboring the Genes for Panton-Valentine Leucocidin. *J Clin Microbiol.* **42**:2080-2084.
  11. Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* **13**:16-34.
  12. Enright, M.C., N.P.J. Day, C.E. Davies, S.J. Peacock, and B.G. Spratt. 2000. Multilocus Sequence Typing for Characterización of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **38**:1008-1015.
  13. Espinosa de los Monteros, L.E., 1993. Reacción de polimerasa en cadena (PCR) en el diagnóstico clínico. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **35**:225-230.
  14. Espinosa de los Monteros, L.E., L.V. Jiménez, M.E. Sepúlveda, B.L. Dávila, A. Hurtado, R.E. Aldana, J.C. Vigueras. 2001. Manual de Bacteriología Básica. Departamento de Bacteriología Intestinal, Hospital Infantil de México "Federico Gómez". 74 p.
  15. Étienne, J. 2001. Manual Bioquímica genética. Biología molecular. Masson. pp 364-365.
  16. Fluit, AD.C., M.R. Visser, and F-J. Schmitz. 2001. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* **14**:836-871.
  17. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2004. Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico. 11<sup>a</sup> ed. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp 181-184, 191-193, 223-225.
  18. Gilot, P., G. Lina, T. Cochard, and B. Poutrel. 2002. Analysis of the Genetic Variability of Genes Encoding the RNA III-Activating Components Agr and TRAP in a Population of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Cows with Mastitis. *Journal of Clinical Microbiology.* **40**:4060-4067.
  19. Giovanetti, E., M.P. Montanari, M. Mingola, and P. Emanuele Varaldo. 1999. Phenotypes an Genotypes of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pyogenes* Strains in Italy and Heterogeneity of Inducibly Resistant Strains. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **43**:1935-1940.

- 
- 
20. Hallin, M., A. Deplano, O. Denis, R. De Mendonça, R. De Ryck, and M.J. Struelens. 2007. Validation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *spa* Typing for Long-Term, Nationwide Epidemiological Surveillance Studies of *Staphylococcus aureus* Infections. *J Clin Microbiol.* **45**:127-133.
  21. Herold, B.C., L.C. Immergluck, M.C. Maranan, D.S. Lauderdale, R.E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C.D. Leitch, R.S. Daum. 1998. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Children With No Identified Predisposing Risk. *JAMA.* **279**:593-598.
  22. Hiramatsu, K., *et al.* 2002. New trends in *Staphylococcus aureus* infections: glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**:407-413.
  23. Huang, H., N.M. Flynn, J.H. King, C. Monchaud, M. Morita, and S.H. Cohen. 2006. Comparisons of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Hospital-Associated MRSA Infections in Sacramento, California. *J Clin Microbiol.* **44**:2423-2427.
  24. Jarraud, S., C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne, and F. Vandenesch. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect. Immun.* **70**: 631-641.
  25. Ji, G., R. Beavis, and R.P. Novick. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science.* **276**:2027-2030.
  26. Jiménez Cardoso, E. 2005. *Genética y Biología Molecular. Aplicación de los procesos biológicos fundamentales.* Editores de textos mexicanos. México. pp 33-49, 51-55.
  27. Kalant, H., and W.H.E. Roschlao. 2002. *Principios de farmacología médica.* 6<sup>a</sup> ed. Oxford University Press. México. pp 683,692-694.
  28. Kaplan, S.L. 2005. Treatment of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Pediatr Infect Dis J.* **24**:457-458.
  29. Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin

- 
- 
- resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents and Chemother. **44**:1549-1555.
30. Kluytmans, J., A. VAN Belkum, and H. Verbrugh. 1997. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. Clin Microbiol Rev. **10**:505-520.
31. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn. 1999. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas color. 5ª ed. Ed. Médica Panamericana. México, D.F. pp 532-535.
32. Leclercq, R., and P. Courvalin. 1991. Bacterial Resistance to Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin Antibiotics by Target Modification. Antimicrob Agents and Chemother. **35**:1267-1272.
33. Lina, G., Y. Piémont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M.O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, and J. Etienne. 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin. Infect. Dis. **29**:1128-1132.
34. Londoño, J.F., G.M. Ortíz, A.M. Gaviria N. 2006. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en personal de la unidad de terapia intensiva de la Clínica Universitaria Bolivariana, Medellín 2004. Infectio. **10**(3):160-166.
35. Lowy, F.D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. **111**:1265-1273.
36. Madigan, M.T, *et al.* 2006. Brock Biology of Microorganisms. Eleventh Edition. Pearson, Prentice Hall. pp 374, 821, 829-830, 864-866.
37. Martínez-Aguilar, G., A. Avalos-Mishaan, K. Hulten, W. Hammerman, E.O. Mason Jr., and S.L. Kaplan. 2004 Community-Acquired, Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Musculoskeletal Infections in Children. Pediatr Infect Dis J. **23**:701-706.
38. McClure, J.A., J.M. Conly, V. Lau, S. Elsayed, T. Louie, W. Hutchins, and K. Zhang. 2006. Novel Multiplex PCR Assay for Detection of the Staphylococcal Virulence Marker Panton-Valentine Leukocidin Genes and

- 
- 
- Simultaneous Discrimination of Methicillin- Susceptible from –Resistant Staphylococci. J Clin Microbiol. **44**:1141-1144.
39. McDougal, L.K., C.D. Steward, G.E. Killgore, J.M. Chaitram, S.K. McAllister, and F.C. Tenover. 2003. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. J Clin Microbiol. **41**:5113-5120.
40. Microbiología! (outside). Antimicrobianos. <http://www.microbiologia.com.ar/antimicrobianos/index.html>
41. Murray, P.R. MMII. Microbiología Médica. 4ª ed. Elsevier. España. pp 182-185, 188-189,198-209.
42. Perera, J., A. Tormo, J.L. García. 2002. Ingeniería Genética. Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. Volumen I. Ed. Síntesis. Madrid, España. pp 57-70.
43. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. Documento M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005; Vol.25 No.1.
44. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá. Departamento de Ciencias Fisiológicas. <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c724.htm>
45. Prats, G. 2006. Microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid. pp 35-36, 56-59, 194-200.
46. Prescott, L.M, *et al.* 2004. Microbiología. 5ª ed. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana. España. pp 141, 476-484, 558-560, 562-570.
47. Raab, U., D. Kahlau, F. Wagenlehner, U. Reischl, V. Ehrenstein, N. Lehn, C. Höller, H.J. Linde. 2006. Prevalence of and Risk Factors for Carriage of Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Among Residents and Staff of a German Nursing Home. Infect Control and Hosp Epidemiol. **27**:208-211.
48. Ramdani-Bouguessa, N., M. Bes, H. Meugnier, F. Forey, M-E. Reverdy, G. Lina, F. Vandenesch, M. Tazir, and J. Etienne. 2006. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Resistant to Multiple

- 
- 
- Antibiotics and Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Genes in an Algiers Hospital. *Antimicrob Agents and Chemother.* **50**:1083-1085.
49. Rang, M.P., M.M. Dale, J.M. Ritter, P.K. Moore. MMIV. *Farmacología.* 5<sup>a</sup> ed., en español. Elsevier. España. pp 639-640, 646-647.
50. Sakoulas, G., G.M. Eliopoulos, V.G. Fowler, Jr., R.C. Moellering, Jr., R.P. Novick, N. Lucindo, M.R. Yeaman, and A.S. Bayer. 2005. Reduced Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to Vancomycin and Platelet Microbicidal Protein Correlates with Defective Autolysis and Loss of accessory gene regulator (*agr*) Function. *Antimicrob Agents and Chemother.* **49**:2687-2692.
51. Shopsin, B., and B.N. Kreiswirth. 2001. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* **7**:323-326.
52. Shopsin, B., B. Mathema, P. Alcabes, B. Said-Salim, G. Lina, A. Matsuka, J. Martínez, and B.N. Kreiswirth. 2003. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. *J Clin Microbiol.* **41**:456-459.
53. Shore, A., A.S. Rossney, C.T. Keane, M.C. Enright, and D.C. Coleman. 2005. Seven Novel Variants of the Staphylococcal Chromosomal Cassette *mec* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Ireland. *Antimicrob Agents and Chemother.* **49**:2070-2083.
54. Steward, C.D., P.M. Raney, A.K. Morrell, P.P. Williams, L.K. McDougal, L. Jevitt, J.E. McGowan, Jr., and F.C. Tenover. 2005. Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **43**:1716-1721.
55. Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology.* Springer-Verlag, Berlín Heidelberg. Pág 412.
56. Tegmark, K., E. Morfeldt, and S. Arvidson. 1998. Regulation of *agr*-Dependent Virulence Genes in *Staphylococcus aureus* by RNA III from Coagulase-Negative Staphylococci. *J Bacteriol.* **180**:3181-3186.
57. Tenover, F. C., L.K. McDougal, R.V. Goering, G. Killgore, S.J. Projan, J.B. Patel, and P.M. Dunman. 2006. Characterization of a Strain of Community-

- 
- 
- Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Widely Disseminated in the United States. *J Clin Microbiol.* **44**:108-118.
58. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol.* **33**:2233-2239.
59. van Belkum, A., W. van Leeuwen, M.E. Kaufmann, B. Cookson, F. Forey, J. Etienne, R. Goering, F. Tenover, C. Steward, F. O'Brien, W. Grubb, P. Tassios, N. Legakis, A. Morvan, N. El Solh, R. De Ryck, M. Struelens, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkila, M. Kooistra, A. Talens, W. Witte, and H. Verbrugh. 1998. Assessment of Resolution and Intercenter Reproducibility of Results of Genotyping *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Sma* I Macrorestriction Fragments: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol.* **36**:1653-1659.
60. Vázquez, J.A., y S. Berrón. 2004. *Multilocus sequence typing*: el marcador molecular de la era en Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **22**:113-120.
61. Velázquez Meza, M. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Publica Mex.* **47**:381-387.
62. Velazquez-Meza, M.E., M. Aires de Sousa, G. Echaniz-Aviles, F. Solórzano-Santos, G. Miranda-Novales, J. Silva-Sanchez, and H. de Lencastre. 2004. 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. *J Clin Microbiol.* **42**:3877-3880.
63. Von Eiff, Christoff., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, and G. Peters. 2001. Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteriemia. *N Engl J Med.* **344**:11-16.
64. Yábar Varas, C. 2003. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN / Elaborado por Carlos Yábar Varas. — Lima : Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. 59 p. : 30 cm. — (Serie de Normas Técnicas; 38).

---

<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf>.

65. Yarwood, J.M., and P.M. Schlievert. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* **112**:1620-1625.
66. Yarwood, J.M., D.J. Bartels, E.M. Volper, and E.P. Greenber. 2004. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J Bacteriol.* **186**:1838-1850.
67. Zetola, N., J.S. Francis, E.L. Nuernberger, W.R. Bishai. 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet infect Dis.* **5**:275-286.
68. Zhang, K., J.A. McClure, S. Elsayed, T. Louie, and J.M. Conly. 2005. Novel Multiplex PCR Assay for Characterización and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **43**:5026-5033.

---

---

## 8. APÉNDICES

### ÁPENDICE I. FUNDAMENTOS Y PROCEDIMIENTOS DE LAS PRUEBAS BÁSICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *S. aureus*.<sup>1,14,31</sup>

TINCION DE GRAM (Hans Cristian Gram [1884]).

Este proceso se denominó así en honor a su inventor, y es utilizado para la clasificación de las bacterias con base en su forma, tamaño, morfología celular, agrupación y características tintoriales.

En un laboratorio de microbiología clínica ésta es una prueba que permite al microbiólogo hacer un pronóstico del agente causal del padecimiento.

La tinción de Gram es una tinción diferencial que nos permite visualizar diferentes tipos bacterianos (Gram +, Gram -) en función de la distinta composición de su pared bacteriana; así como también, el visualizar su morfología y disposición.

*Fundamento.* Las bacterias Gram (+) adquieren una coloración azul/violeta debido al gran porcentaje (60-80) de peptidoglicano que poseen en su pared celular, por lo que retienen el cristal violeta, (que en el interior de la célula ha formado un complejo con el lugol), aún después de la coloración moderada de alcohol-acetona. Ciertas bacterias, pierden la tinción primaria con cristal violeta, al ser decoloradas; esto es debido a que contienen alto contenido de lípidos en su pared celular, además de un bajo porcentaje de peptidoglicano (20-40); por lo tanto adquieren el color de la safranina. Cuando se observan al microscopio se ven de color rojo y se denominan Gram (-).

#### *Procedimiento*

- Fijar el frotis al calor.
- Aplicar sobre el portaobjetos el primer colorante que corresponderá a cristal violeta durante 1 minuto.
- Lavar con agua para eliminar el exceso del colorante.

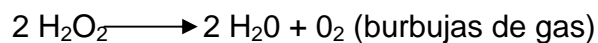


- 
- 
- Añadir un mordiente, el lugol, que actuara fijando el colorante anterior a las bacterias, aplicándose durante 1 minuto.
  - Se vuelve a eliminar el exceso mediante un lavado con agua.
  - Decolorar con alcohol-acetona hasta arrastrar todos los restos.
  - Lavar con agua.
  - Cubrir el portaobjetos con el segundo colorante o colorante de contraste (safranina) durante un minuto.
  - Dejar secar al aire y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

*Interpretación.* Se observan por campo bacterias de color azul violáceo que corresponden a bacterias Gram + y/o bacterias de color rojo rosado que corresponden a Gram -.

## CATALASA

*Fundamento.* Se basa en comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Esta enzima participa en la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua según la siguiente reacción:



El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos del carbono. Si se permite que se acumule, resulta letal para las bacterias.

Excepto los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa.

### *Procedimiento*

- Con una asa de inoculación o con un palillo de madera, transferir parte del centro de una colonia pura a la superficie de un portaobjetos.

- 
- 
- Agregar una gota de peróxido de hidrógeno con un gotero y observar la formación de burbujas (liberación de gas).

*Interpretación.* La aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva.

Nota: Debido a que algunas bacterias poseen enzimas distintas de la catalasa que pueden descomponer el peróxido de hidrógeno, la observación de unas pocas burbujas pequeñas después de 20 a 30 segundos no se considera un resultado positivo. Además, es importante tener precaución de no realizar la prueba a partir de agar sangre, debido a que se podrían obtener falsos positivos puesto que los eritrocitos poseen catalasa.

#### *Controles*

- Control positivo: *Staphylococcus aureus*.
- Control negativo: *especies de Streptococcus*.

#### OXIDASA

El objetivo de esta prueba es identificar la presencia de la enzima oxidasa o citocromo oxidasa producida por ciertas bacterias. Dicha reacción se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que actúa a su vez como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones produciendo a partir del hidrógeno agua o peróxido de hidrógeno, según la especie bacteriana y su sistema enzimático.

El sistema de citocromo sólo se encuentra por lo general en microorganismos aerobios, lo que los hace capaces de utilizar el oxígeno como un aceptor de hidrógeno final para reducir el oxígeno molecular en peróxido de hidrógeno, el último enlace de la cadena respiratoria aeróbica.

---

---

Algunos autores aseguran que la reacción oxidasa positiva está limitada a organismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno atmosférico y producir al mismo tiempo la enzima catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno, ya que su acumulación es tóxica.

*Fundamento.* En la prueba de citocromooxidasa se utilizan ciertos colorantes reactivos, como clorhidrato de *p*-fenilendiamina, que sustituyen al oxígeno como aceptores de electrones. En estado reducido el colorante es incoloro; sin embargo, en presencia de citocromooxidasa y oxígeno atmosférico, la *p*-fenilendiamina es oxidada, y forma azul de indofenol.

#### *Procedimiento*

- Con un aplicador de madera, tomar una colonia y colocarla sobre un pedazo de papel filtro impregnado con reactivo de Kovac's (diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%). Actualmente es más común el uso de tiras o discos comerciales impregnados con el reactivo. No deben usarse asas o alambres de inoculación de acero inoxidable para esta prueba porque productos de oxidación superficial formados al esterilizar el asa o alambre con la llama de un mechero Bunsen pueden dar como resultado reacciones falso-positivas.

#### *Interpretación*

- Prueba positiva. Las colonias bacterianas que tienen actividad de citocromooxidasa desarrollan un color azul oscuro en el sitio de inoculación en un lapso no mayor de 10 segundos.
- Prueba negativa. No hay cambio de color sobre la tira o disco, o bien éste ocurre después de 10 segundos.

#### *Controles*

- Control positivo: *Pseudomonas aeruginosa*.
- Control negativo: *Escherichia coli*.

---

---

## CRECIMIENTO EN CALDO BHI AL 15% DE NaCl

Con el desarrollo de microorganismo en caldo BHI suplementado 15% de cloruro de sodio (NaCl), se puede diferenciar a los estafilococos de los micrococos, ya que éstos últimos no crecen en concentración de NaCl del 15%.

### *Procedimiento*

- En un tubo de vidrio (13x100) con 3 mL de caldo BHI con 15% de NaCl, colocar en la pared del tubo una colonia aislada, de tal forma que quede cubierta con el caldo.
- Incubar a 37 °C durante 24 horas.
- Leer a las 24 horas el tubo (la turbidez en el medio indica crecimiento de la cepa).

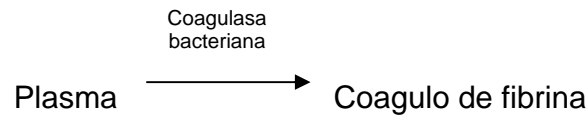
### *Interpretación*

- Crecimiento en caldo BHI al 15% de NaCl: *Staphylococcus spp.*
- No crecimiento en caldo BHI al 15% de NaCl: *Micrococcus spp.*

## PRUEBA DE LA COAGULASA

Los estafilococos se pueden dividir en dos grupos en base a su capacidad de coagular el plasma: estafilococos coagulasa positivos (*S. aureus*) y estafilococos coagulasa negativo (*S. epidermidis* y *S. saprophyticus*).

*Fundamento.* La prueba de la coagulasa, se basa en la capacidad de un microorganismo de coagular el plasma al convertir el fibrinógeno en fibrina, por acción de la enzima coagulasa (proteína de composición química, que tiene actividad similar a la protombina).



La coagulasa se presenta en dos formas, ligada y libre; y cada una posee diferentes propiedades que requieren el uso de distintos procedimientos de ensayo; sin embargo, se abordará solamente la prueba en tubo para coagulasa libre.

Coagulasa libre (prueba en tubo): la coagulasa libre es una sustancia similar a la trombina presente en filtrados de cultivos. Cuando en un tubo de ensayo se prepara una suspensión en plasma de microorganismos productores de coagulasa, se forma un coágulo visible como resultado de la reacción de la coagulasa con una sustancia del plasma (factor de reacción con la coagulasa), para formar un complejo que a su vez reacciona con el fibrinógeno para producir el coágulo de fibrina.

#### *Procedimiento*

- En un tubo de vidrio colocar asépticamente 0.5 mL de plasma diluido 1:3 en caldo BHI.
- Con una asa bacteriológica tomar una a dos colonias bien aisladas y disolverlas en el plasma.
- Incubar a 37 °C durante 4 horas observando el tubo a intervalos frecuentes (primero en 1 hora y posteriormente cada hora hasta completar las 4 horas) para ver si se forma un coágulo inclinando ligeramente el tubo. Si en ese momento no se observan coágulos, reincubar el tubo a 37 °C y leer nuevamente hasta las 18 o 24 horas después.

#### *Interpretación*

- Se considera *positiva* si se detecta cualquier grado de formación de coágulos. El tubo se inclina con suavidad y no se agita, debido a que la agitación puede

---

---

deshacer los coágulos parcialmente formados. Algunas cepas de *S. aureus* producen fibrinolisinias que disuelven el coágulo recién formado; por esto pueden pasar pruebas positivas desapercibidas si no se observa el tubo a intervalos frecuentes.

- Los tubos que son negativos después de 4 horas se incuban a 37 °C durante la noche y se leen después de 18 horas.

#### *Controles*

- La coagulabilidad del plasma se controla agregando una gota de cloruro de calcio al 5% a 0.5 mL del plasma reconstituido. Debe formarse un coágulo en el término de 10 a 15 segundos.
- Una cepa conocida de *Staphylococcus aureus* y una de *S. epidermidis* pueden servir de control positivo y negativo, respectivamente.

---

---

## APENDICE II. PROCEDIMIENTO DE LAS TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

### MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DNA WIZARD® GENOMIC, PROMEGA

#### *Procedimiento*

Después de la digestión enzimática con lisostafina, lisozima y proteinasa K, se continúa con la extracción utilizando el kitt de extracción de DNA Wizard® para cocos gram positivos con algunas modificaciones en los tiempos de centrifugación:

#### ➤ Lisis celular.

- Adicionar 600 µL de la solución de lisis de núcleo (Mezclar con la micropipeta) a 200 µL de la solución de lisis en un nuevo tubo.
- Incubar 5 minutos a 80 °C y dejar a temperatura ambiente.
- Adicionar 3 µL de solución RNAasa e incubar a 37 °C por 30 minutos. Después dejar a temperatura ambiente.

#### ➤ Precipitación de proteínas.

- Adicionar 200 µL de la solución de precipitación de proteínas. Agitar en vórtex.
- Incubar sobre un baño de hielo por 5 minutos.
- Centrifugar a 13,000 rpm por 3 minutos.

#### ➤ Precipitación de DNA y rehidratación.

- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 600 µL de isopropanol que esté a temperatura ambiente (Mezclar). \*Refrigerar toda la noche a -20 °C.
- Después de la refrigeración, centrifugar por 3 minutos a 13,000-16,000 rpm y decantar el sobrenadante.

- 
- 
- Realizar tres lavados con 300  $\mu$ L de etanol al 70% que este a temperatura ambiente, centrifugando por 3 minutos a 13,000-16,000 rpm en cada uno de los lavados.
  - Aspirar el etanol con una micropipeta y secar al aire por 10-15 minutos.
  - Rehidratar el DNA en 100  $\mu$ L en solución de rehidratación (TE) por 1 hora.
  - Esta solución se puede conservar a 4 °C para uso inmediato y a -70 °C para períodos prolongados.

## ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA<sup>26,64</sup>

### *Procedimiento*

#### 1) Preparación del gel de agarosa

- El gel de agarosa se prepara al 1.2% p/v en TBE 0.5X. Así, 1.2 g de agarosa se disuelve en 100 mL de TBE 0.5X con la ayuda de un horno de microondas o en baño María, hasta que se observe una solución de consistencia homogénea y transparente.
- Posteriormente la agarosa se deja enfriar hasta que alcance una temperatura entre 50 °C y 60 °C.
- Enseguida, la agarosa se añade en un volumen dependiente de la base o contenedor del gel asegurando tener los peines debidamente insertados (fig. 19).

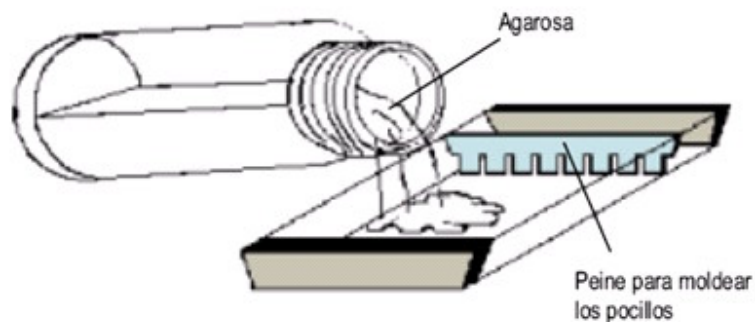


Figura 19. Preparación del gel de agarosa para DNA.



- 
- Luego, la agarosa se deja enfriar hasta que solidifique, y después de que solidifique completamente, el peine se retira y la base o contenedor del gel con la agarosa, se coloca dentro de la cámara de electroforesis y se añade el amortiguador de electroforesis TBE 0.5X hasta la marca correspondiente de la cámara de electroforesis (fig. 20).

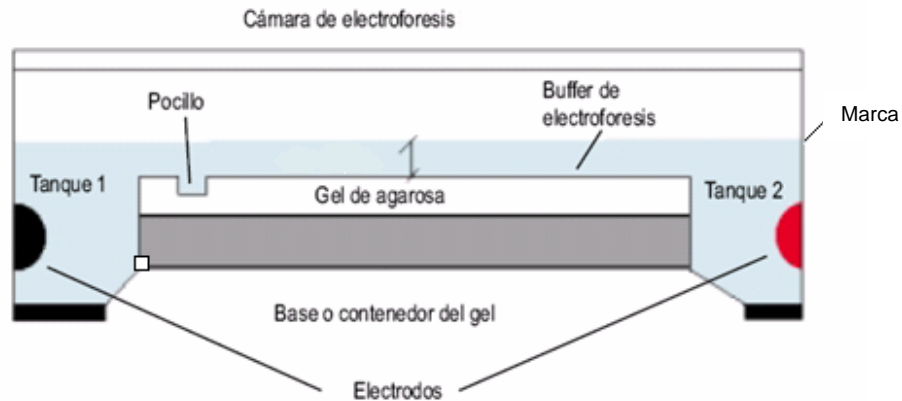


Figura 20. Corte sagital de un sistema de electroforesis de DNA en geles de agarosa.

## 2) Desarrollo de la electroforesis

- Mediante el uso de una micropipeta, se mezcla 5  $\mu$ L de solución conteniendo DNA con 2  $\mu$ L del amortiguador de carga o amortiguador de la muestra (azul de bromofenol), y se procede a cargar cuidadosamente la muestra en los pocillos, evitando la contaminación del pocillo contiguo. Considerar el uso de un marcador estándar de DNA para la medición del peso molecular de la muestra. Dicho marcador también debe ser mezclado con el amortiguador de carga excepto cuando ya se encuentra previamente mezclado con el amortiguador.
- Una vez finalizada la colocación del DNA en los pozos, cubrir la cámara con la tapa y conectar los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder.
- Encender la fuente de poder y proceder a seleccionar el voltaje adecuado. Aplicar un voltaje de acuerdo al peso molecular de las moléculas de DNA que se va a separar. Para el caso de productos de PCR (entre 100 pb a 1,5 kb), se

---

---

recomienda usar voltajes comprendidos entre 75 a 100 voltios. Para muestras de DNA genómico y plasmídico (> 2 kb) se recomienda aplicar valores entre 25 y 75 voltios. En este estudio se utilizaron las siguientes condiciones: 90V, 45mA/50 minutos.

- Luego de seleccionar las condiciones de voltaje iniciar la electroforesis. Durante el corrimiento el amortiguador de carga permite tener una idea de la ubicación aproximada de la muestra de DNA en el gel.
- Finalizada la electroforesis se procede al desmontaje del equipo empezando con desconectar los electrodos de la fuente de poder ya apagada y removiendo el sistema que contiene el gel de agarosa.
- El amortiguador de electroforesis puede ser devuelto a su frasco original para su posterior uso en un siguiente procedimiento. Limpiar la cámara de electroforesis con chorro suave de agua destilada. Secar a temperatura ambiente.

### 3) Visualización de bandas de DNA por coloración con bromuro de etidio.

- Con el uso de guantes, se sumerge el gel de agarosa en un envase conteniendo bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL diluido en agua desionizada y se deja incubando por 15 minutos en reposo.
- Transcurrido el tiempo, se devuelve la solución de bromuro de etidio en su frasco original.
- El gel se traslada hacia un cuarto oscuro donde se encuentre un transiluminador de luz UV y se deposita cuidadosamente sobre la pantalla del transiluminador.
- Se cierra la cubierta del transiluminador y se visualizan las bandas de DNA contra la luz UV, y posteriormente se toma una foto.

---

---

### APENDICE III. PREPARACION DE SOLUCIONES PARA PFGE.

#### SOLUCIÓN DE LAVADO PIV

Reactivo	Concentración inicial	Volumen para 30 mL	Concentración final
Tris-HCl	2M	150 $\mu$ L	10mM
NaCl	5M	6mL	1M
H <sub>2</sub> O destilada estéril	-	24mL	-

#### SOLUCIÓN DE LISIS EC

Reactivo	Concentración inicial	Volumen para 20 mL	Concentración final
Tris-HCl	2M pH 7.6	60 $\mu$ L	6mM
NaCl	5M	4mL	1M
EDTA	0.5M pH 7.6	4mL	0.1M
Brij 58	10%	1mL	0.5%
Desoxicolato	10 %	400 $\mu$ L	0.2%
Sarcosil	20 %	500 $\mu$ L	0.5%
RNAasa	10 mg/mL	40 $\mu$ L	20 $\mu$ g/mL
Lisozima	10 mg/mL	200 $\mu$ L	0.1 mg/mL
H <sub>2</sub> O	-	9.8mL	-

#### SOLUCIÓN DE DESPROTEINIZACIÓN ESP

Reactivo	Concentración inicial	Volumen para 20 mL	Concentración final
EDTA	0.5M pH 9.0	19mL	Aprox. 0.5M
Sarcosil	20 %	1mL	1%
Proteinasa K	10 mg/mL	100 $\mu$ L	50 $\mu$ g/mL

---

---

## MEZCLA DE RESTRICCIÓN

Reactivo	Concentración inicial	Volumen para 200 $\mu$ L	Concentración final
Amortiguador de restricción	10X	20 $\mu$ l	1X
<i>Sma</i> I	10 U/ $\mu$ L	3.0 $\mu$ l	30 U
H <sub>2</sub> O	-	177.0 $\mu$ L	-