

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Expresión RNA III en aislamientos intrahospitalarios de *S. aureus*
multirresistentes y sensibles**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

QFB. VICENTA CÁZARES DOMÍNGUEZ

DIRECTORES DE TESIS

**Dr. José de Jesús Olivares Trejo
Dra. Norma Velázquez Guadarrama**

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORES DE TESIS

Dr. José de Jesús Olivares Trejo
Profesor-Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra Norma Velázquez Guadarrama
Investigador en Ciencias Médicas.
Hospital Infantil de México Federico Gómez

ASESORES

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Profesora-Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. José Arellano Galindo
Investigador en Ciencias Médicas A.
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Gerardo Aparicio Ozores
Profesor Titular. Bacteriología Médica.
Instituto Politécnico Nacional



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

Este proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de Bacteriología Intestinal, del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la tutoría de la Doctora en Ciencias Norma Velázquez Guadarrama. El protocolo fue financiado con Fondos Federales, clave CO/2007/04.

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 1 del posgrado en ciencias genómicas de la UACM, bajo la dirección del Doctor en Ciencias José de Jesús Olivares Trejo y contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) (Proyecto Número 54212 de Ciencia Básica 2006)

Abreviaturas

A	Adenina
aa	Aminoácido
<i>Agr</i>	Accessory gen regulator (Gen regulador accesorio)
AIP	Péptido autoinducido
BHI	Brain heart infusión (Caldo infusión cerebro corazón)
BrEt	Bromuro de etidio
C	Citocina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (centros de prevención y control de enfermedades)
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Clinical and laboratory standard institute, antes NCCLS: (National committee for clinical laboratory standards)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleósido 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilén- diamino- tetraacético
ETA	Toxina exfoliativa tipo A
ETB	Toxina Exfoliativa tipo B
FDA	Food and drug administration
G	Guanina
h-VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia heterogénea a vancomicina
IgG	Inmunoglobulina tipo G
Kb	Kilobases o mil pares de bases
LCR	Líquido cefalorraquídeo

Lpl	Lipoproteínas
MGEs	Elementos genéticos móviles
MLST	Tipado mediante secuenciación multilocus (Multilocus sequence typing)
NNISS	National Nosocomial Infection Surveillance System
ORF	(Open reading frame (marco de lectura abierta)
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	Electroforesis por Campos Pulsados
PVL	Panton valentine leucocidin
RHOVE	Red hospitalaria de vigilancia epidemiológica
SAK	Estafiloquinasa
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SAMS	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
SAMR-CA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente adquirido en la comunidad
SAMS-HA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino sensible adquirido en el hospital
SaPIs	Islas de patogenicidad
SCCmecA	Staphylococcal cassette chromosome mecA (Cassette estafilocócico cromosomal del gen <i>mecA</i>)
SNPs	Polimorfismos nucleotídicos únicos
T	Tirosina
TBE	Tampón tris + ácido bórico + EDTA
TE	Tampón tris HCl + EDTA

Tris	Hidroximetil aminoetano
TSST-1	Toxina-1 del síndrome de choque tóxico
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VISA	Staphylococcus <i>aureus</i> con resistencia Intermedia a vancomicina
VRSA	Staphylococcus <i>aureus</i> resistente a vancomicina

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por la formación académica otorgada.

Al Colegio de Profesores-Investigadores del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por sus valiosas enseñanzas.

A mis directores de tesis y asesores:

A la Dra Norma Velázquez por su asesoramiento científico y porque gracias a su apoyo y consejo he llegado a realizar una más de mis metas.

Al Dr José de Jesús Olivares por su gran interés y compromiso en la realización de este trabajo.

A la Dra Elisa Irene Azuara por su valiosa colaboración en la corrección del escrito.

Al Dr José Arellano por sus substanciales sugerencias en la redacción de la tesis.

Al Dr Gerardo Aparicio por sus observaciones críticas en la redacción del escrito.

Al Dr Alfonso Reyes por su orientación en el análisis estadístico de los datos.

A la M en C. Arelí Cruz por su asesoramiento en el trabajo de laboratorio, durante mi estancia en la UACM.

A Brenda por haberme brindado su amistad y consejos durante mi estancia en la UACM.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Paty, Vero, Alma, Nona y Alberto porque con su amistad y apoyo me animaron siempre a seguir adelante.

Deseo expresar mi gratitud a mis compañeros y amigos de laboratorio de Bacteriología por sus enseñanzas en el manejo de las técnicas microbiológicas: Kary, Mary, Lety, Maru, J.C.

A Gerardo por su invaluable ayuda en la toma de fotos.

A Alma por su apoyo y consejos durante aquellos momentos que parecía que todo estaba perdido.

A Don Alex y Don Richi por haberme brindado su amistad y sobretodo por su ayuda en la preparación de material.

A Marce por su amistad y apoyo administrativo.

A las dos personitas más importantes de mi vida: Diana y Liz.

Indice General

Resumen	1
Introducción	2
1 Características generales de <i>S. aureus</i>	2
1.1 Taxonomía	2
1.2 Características microscópicas y de tinción	2
1.3 Características de cultivo	3
1.4 Pruebas de identificación de <i>S. aureus</i>	4
1.4.1 Pruebas bioquímicas	4
a) Coagulasa	4
b) Dnasa	4
c) Aureasa	4
1.4.2 Pruebas de aglutinación	4
a) Receptor de fibrinógeno	4
b) Proteína A	4
1.5 Epidemiología	5
1.6 Características genéticas de <i>S. aureus</i>	7
1.6.1 Genómica comparativa de <i>S. aureus</i>	7
1.6.2 Genoma accesorio	8
1.6.2.1 Bacteriófagos	8
1.6.2.2 Islas genómicas	10
1.6.2.3 Islas de patogenicidad	10
1.6.2.4 Casete cromosomal estafilocócico (SCC)	11
1.6.2.5 Plásmidos	12
1.6.2.6 Transposones	13
2 Factores de virulência	13
2.1 Producción de factores de virulência	14
2.2 Gen regulador accesorio estafilocócico (Sistema Quórum sensing)	15
2.3 Proteína A	19
2.4 Hemolisinas	19

3 Resistencia antibiótica en <i>S. aureus</i>	20
3.1 Principales grupos de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones producidas por <i>S. aureus</i>	22
3.2 Evolución de la resistencia antibiótica en <i>S. aureus</i>	23
3.3 Mecanismos de resistencia	24
3.3.1 Resistencia antibióticos beta lactámicos	24
a) Generalidades penicilinas semisintéticas	24
b) Mecanismo de resistencia penicilina	25
c) Mecanismo de resistencia meticilina	25
3.3.2 Resistencia macrólidos–lincosamidas-estreptograminas-cetólidos (MLSK)	26
a) Características generales del grupo MLSK	26
b) Mecanismo de resistencia del grupo MLSK	27
3.3.3 Resistencia glucopéptidos	28
a) Características generales de los glucopéptidos	28
b) <i>S. aureus</i> con resistencia heterogenea a vancomicina (hetero-VISA y <i>S. aureus</i> con resistencia Intermedia a vancomicina (VISA)	28
c) <i>S. aureus</i> resistente a vancomicina (VRSA)	29
d) Mecanismo de resistencia a vancomicina	31
II Estado del arte	32
III Antecedentes particulares del proyecto	34
IV Importancia de continuar el estudio	35
V Hipótesis	35
VI Objetivos	35
VII Estrategia Experimental	36
VIII Material y Métodos	37
1 Diseño del estudio	37
1.1 Universo de estudio	37
1.2 Definición de variables	37
1.3 Criterios de inclusión	37
1.4 Criterios de exclusión	37
1.5 Obtención de cepas de <i>S. aureus</i>	38
1.6 Puebas de identificación de <i>S. aureus</i>	38

1.7	Susceptibilidad a antimicrobianos	38
1.7.1	Método de dilución en agar	38
1.8	Genotipificación del gen <i>agr</i> de <i>S. aureus</i>	39
1.8.1	Extracción de DNA de <i>S. aureus</i>	39
1.8.2	PCR múltiple para identificar grupos <i>agr</i> específicos	39
1.9	Expresión de delta hemolisinas en las cepas de <i>S. aureus</i> multirresistentes y sensibles	40
1.10	1.10 Análisis de la expresión de los genes <i>spa</i> y <i>hld</i> de <i>S. aureus</i>	41
1.10.1	Extracción de RNA total	41
1.10.2	Análisis de la expresión de los genes <i>spa</i> y <i>hld</i> por RT-PCR	41
1.10.3	Análisis densitométrico de la expresión de los genes <i>hld</i> y <i>spa</i> por RT-PCR	42
1.10.4	Análisis estadístico	43
IX	Resultados	44
X	Discusión	53
XI	Bibliografía	57
	Apéndices	68
Apéndice 1	Pruebas de identificación de <i>S. aureus</i>	68
Apéndice 2	genes accesorios de <i>S. aureus</i>	71
Apéndice 3	Valores de susceptibilidad de los antibióticos utilizados de acuerdo al CLSI	72
Apéndice 4	Método de extracción de DNA Wizard	73
 Índice de figuras		
Figura 1	Morfología microscópica	2
Figura 2	Morfología colonial de <i>S. aureus</i> en agar sangre	3
Figura 3	Representación esquemática del SCCmec de la cepa MRSA	11
Figura 4	Modelo de la producción de factores de virulencia en las infecciones por <i>S. aureus</i>	15
Figura 5	Gen regulador accesorio (<i>agr</i>) de <i>S. aureus</i>	17
Figura 6	Mapa esquemático del operon <i>agr</i> (P2) de <i>S. aureus</i>	18
Figura 7	PGFE de DNA genómico de dos cepas de <i>S. aureus</i> aisladas del mismo paciente antes y después de tratamiento con vancomicina	34

Figura 8	Estrategia experimental	36
Figura 9	Ensayo de PCR múltiple para la identificación de grupos <i>agr</i> específicos	46
Figura 10	Expresión fenotípica de delta hemolisinas	47
Figura 11	Expresión por RT-PCR de los genes <i>hld</i> y <i>spa</i> de aislados clínicos de <i>S. aureus</i> multirresistentes	48
Figura 12	Expresión por RT-PCR de los genes <i>hld</i> y <i>spa</i> de aislados clínicos de <i>S. aureus</i> sensibles	49
Figura 13	Análisis densitométrico de la expresión del gen <i>hld</i> por RT-PCR	50
Figura 14	Análisis densitométrico de la expresión del gen <i>spa</i> por RT-PCR	51

Indice de tablas

Tabla 1	Elementos genéticos móviles en cepas secuenciadas de <i>S. aureus</i>	9
Tabla 2	Principales factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	14
Tabla 3	Principales antibióticos en los que se ha encontrado resistencia en cepas de <i>S. aureus</i>	21
Tabla 4	Secuencia de primers utilizados en el ensayo de PCR múltiple	40
Tabla 5	Condiciones utilizadas para la amplificación de los tipos <i>agr</i>	40
Tabla 6	Secuencia de primers de los genes <i>hld</i> y <i>spa</i> utilizados en el ensayo de RT-PCR	42
Tabla 7	Condiciones utilizadas para las amplificaciones de los genes <i>hld</i> y <i>spa</i> , en el ensayo de RT-PCR	42
Tabla 8	Patron de susceptibilidad de las Cepas de <i>S. aureus</i> multirresistentes	45
Tabla 9	Patron de susceptibilidad de las Cepas de <i>S. aureus</i> sensibles	45
Tabla 10	Grupo <i>agr</i> al que pertenecen los aislados de <i>S. aureus</i> multirresistentes y sensibles	46
Tabla 11	Expresión fenotípica de delta hemolisinas en aislados de <i>S. aureus</i> multirresistentes y sensibles	47
Tabla 12	Prueba de Wilcoxon para contrastar datos pareados	52

Resumen

S. aureus es causa común de infecciones intrahospitalarias a nivel mundial. 60% de *S. aureus* son resistentes a meticilina (SAMR) y la mayoría ha desarrollado resistencia a más de 20 antibióticos, quedando como única opción de tratamiento la vancomicina. Sin embargo, la emergencia de cepas con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) y recientemente cepas resistentes a vancomicina (VRSA) ha limitado su efectividad. El fenotipo VISA se caracteriza por pérdida de función de *agr* y polimorfismo *agr* II, lo que sugiere que las clonas con este polimorfismo tienen ventaja, cuando están bajo presión selectiva de vancomicina. *agr* regula la transcripción de varios genes de virulencia, que codifican para toxinas, enzimas y proteínas de superficie celular vía la molécula RNAIII; aunque *agr* no es esencial para el crecimiento de *S. aureus in Vitro*, diversos estudios han mostrado su importancia para la virulencia en modelos animales. **Objetivo:** Evaluar la expresión de la molécula RNAIII en *S. aureus* multirresistentes versus sensibles en las fases de crecimiento exponencial y pos exponencial. **Material Y Métodos:** Se emplearon 33 *S. aureus* previamente aislados de procesos infecciosos invasivos y conservados en el cepario del HIMFG, del período de enero 2006 a junio 2007. Se clasificaron en multirresistentes y sensibles, se determinó de forma semicuantitativa la transcripción de los genes *hld* y *spa* regulados por la molécula RNAIII en los dos grupos de cepas por RT-PCR punto final en las fases de crecimiento exponencial y pos-exponencial. Se realizó densitometría de los amplificadores y los valores fueron analizados estadísticamente por prueba de T pareada con un intervalo de confianza del 95%. **Resultados:** Se encontraron 20 cepas de *S. aureus* multirresistentes y 13 sensibles. En las cepas multirresistentes predominó el tipo *agr* II. Los resultados de RT-PCR muestran que la transcripción de los genes *hld* y *spa* en el grupo de cepas multirresistentes, disminuyó significativamente de la fase de crecimiento exponencial a la fase pos- exponencial, mientras que en el grupo de cepas sensibles la disminución no fue estadísticamente significativa, lo que sugiere que la multirresistencia modifica la transcripción de RNAIII.

I Introducción

1. Características generales de *S. aureus*

1.1 Taxonomía

El Manual Bergey de Bacteriología Sistemática clasifica a *Staphylococcus aureus* como, miembro del *phylum Firmicutes*; Clase *Bacilli*; Orden *Bacillales*; Familia *Staphylococcaceae*; Género *Staphylococcus*. La familia *Staphylococcaceae*, agrupa otros 3 géneros de nula importancia médica (*Gemella*, *Macrococcus* y *Salinicoccus*). Dentro del género *Staphylococcus* hay 48 especies, siendo las más importantes desde el punto de vista clínico (*S. aureus*, *S. epidermidis*, y *S. saprophyticus*) (Prescott, 2004).

1.2 Características microscópicas y de tinción

En las tinciones de gram los estafilococos se evidencian como cocos gram positivos de 0.5 a 1 μM de diámetro dispuestos en racimos, aunque también se les puede encontrar en cadenas cortas o diplococos, no tienen flagelos, no forman esporas, la mayoría tiene capsula. **Figura 1** (Mc Faddin, 2003).

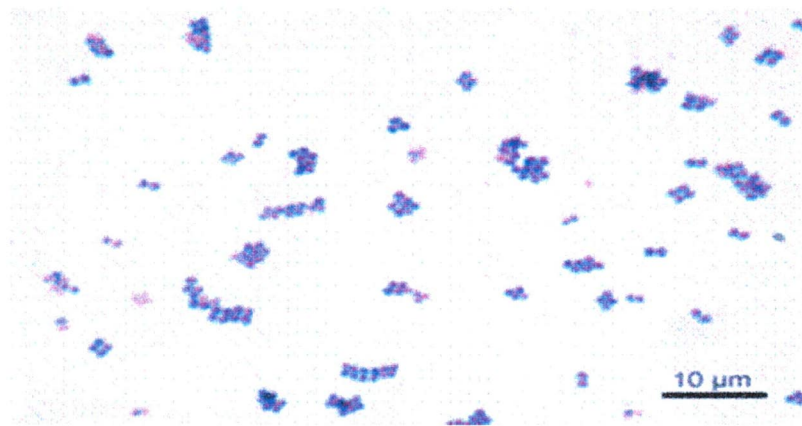


Figura 1. Morfología microscópica. Tinción de gram, cocos gram- positivos 0.5-1 μicras , agrupados en racimos.

1.3 Características de cultivo

Los estafilococos son poco exigentes en sus necesidades nutricionales; crecen bien en cualquier medio, aunque lo hacen mejor en los medios enriquecidos. Son aerobios y anaerobios facultativos, con una temperatura óptima entre 30 y 37°C. Una particularidad de los miembros de este género es que crecen en medios con una concentración de NaCl que no soportan el resto de los microorganismos (bacterias halófilas), lo que permite la creación de medios de cultivo selectivos para los estafilococos. Las colonias son visibles fácilmente, sobre todo en agar sangre, con forma redonda y aplanada, bordes enteros, superficie lisa y brillante, consistencia variable, sin olor y generalmente β hemolíticas. Algunas cepas pueden producir un pigmento carotenoides que les da una coloración amarillenta. **Figura 2** (Velázquez-Meza y col, 2005; Prats, 2006;).

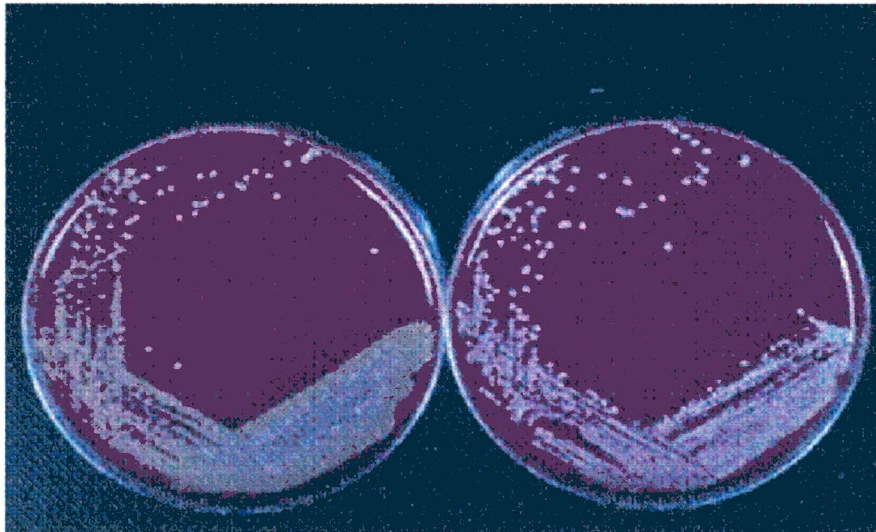


Figura 2. Morfología colonial de *S. aureus* en agar sangre. Lado izquierdo: cultivo de *S. aureus* de 24 horas a 37°C; se observan colonias medianas, blancas, cremosas brillantes. Lado derecho: el mismo cultivo de *S. aureus* después de 48 horas a 37°C: se pueden ver esas mismas colonias blancas ahora de color amarillo.

1.4 Pruebas de identificación de *S. aureus*

1.4.1 Pruebas bioquímicas

a) Coagulasa: Se basa en la capacidad de este enzima de producir un coágulo visible al mezclar una suspensión de microorganismos con plasma de conejo. Esta prueba permite diferenciar *S. aureus* de otras especies de estafilococos coagulasa negativo (SCN) (Mc Faddin y col, 2003; Prats, 2006).

b) Catalasa: Se basa en la capacidad de la enzima catalasa de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y O₂, el cual se libera en forma de burbujas. Esta prueba se utiliza para diferenciar a *S. aureus*, de los estreptococos, que por morfología y tinción gram, pueden aparecer de forma similar, pero que son catalasa negativos (Mc Faddin y col, 2003; Prats, 2006).

c) DNasa: *S. aureus* posee una DNasa termoestable que puede ser investigada tanto en un medio de cultivo específico, como por procedimientos inmunológicos, que permiten poner de manifiesto esta enzima incluso en medios de cultivo líquidos (Mc Faddin col, 2003; Prats, 2006).

d) Aureasa: Esta enzima es específica de *Staphylococcus aureus* y se manifiesta mediante una fluorescencia visible bajo luz ultravioleta (Mc Faddin, 2003; Bannerman, 2003).

1.4.2 Pruebas de aglutinación

a) Receptor de fibrinógeno (factor de aglomeración): *S. aureus* posee un receptor proteico para un fragmento del fibrinógeno. Este receptor está presente en el 96% de las cepas de origen humano. Los eritrocitos de cordero estabilizados y sensibilizados con fibrinógeno aglutinan cuando se ponen en presencia de una cepa de *S. aureus* que posea este receptor (Mc Faddin y col, 2003; Murray y col, 2005).

b) Proteína A: En la superficie de *S. aureus* se encuentra la proteína A, que reacciona selectivamente con el fragmento Fc de la mayoría de las IgGs. Esta proteína es producida en todos los medios de cultivo, pero más débilmente en agar sangre. Está presente aproximadamente en el 90% de las cepas. Las partículas de látex sensibilizadas con IgGs, son aglutinadas cuando se ponen en presencia de una cepa de *S. aureus* portadora de este receptor (Mc Faddin y col, 2003; Murray y col, 2005).

1.5 Epidemiología

S. aureus es reconocido como agente causal de infecciones desde 1883, cuando Alexander Ögston lo aisló por primera vez en sepsis y abscesos, es considerado el principal patógeno en personas sanas inmunocompetentes en la comunidad. Las infecciones hospitalarias debidas a *S. aureus*, son un problema de salud pública de gran trascendencia económica y social, debido a que presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad. En EUA se reporta una incidencia promedio del 3 al 5%. En México se reporta 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%. Las infecciones más frecuentes son en vías urinarias, seguidas por la de herida quirúrgica, bacteriemias y neumonías (Bustos-Martínez, 2006).

S. aureus se encuentra de manera natural sobre la piel y la nasofaringe del cuerpo humano, no tiene otros hábitats importantes, excepto cuando está involucrada en infecciones. La piel y las membranas mucosas son excelentes barreras contra la invasión de tejido local por *S. aureus*. Sin embargo, si cualquiera de estas es rota debido a trauma o cirugía puede penetrar al tejido y causar sus característicos abscesos, alcanzar canales linfáticos o sangre y causar septicemia (Velázquez Meza y col, 2005).

S. aureus se transmite por contacto de persona a persona, de un individuo con infección respiratoria como neumonía, una herida quirúrgica, a través de las manos o la piel de un portador asintomático; también puede ser transmitido por partículas de aire o contacto con objetos contaminados (Daum y col, 2001).

En poblaciones sanas aproximadamente 20% porta a *S. aureus* de manera persistente, 60% porta la infección de manera intermitente y cerca del 20% no lo porta (Shittu y col, 2007).

S. aureus puede causar una amplia gama de infecciones que incluyen: 1) Infecciones en piel y tejidos blandos como impétigo buloso y no buloso, foliculitis, celulitis. 2) infecciones en heridas quirúrgicas. 3) infecciones sistémicas que ponen en peligro la vida como la endocarditis, la osteomielitis, la neumonía, los abscesos cerebrales, la meningitis y las bacteriemias. 4) toxemias como intoxicación alimentaria, síndrome de choque tóxico y síndrome de piel escaldada (Shittu y col, 2007).

Los estafilococos reportan un notable aumento en el nivel de resistencia a antibióticos, especialmente *S. aureus* meticilino resistente (SAMR) que se ha convertido

en uno de los patógenos más importantes causante de infecciones nosocomiales en todo el mundo (Velázquez-Meza y col, 2005; Shittu y col, 2007). Cuando una persona entra en contacto con una cepa SAMR: puede resultar colonizada, desarrollar una infección y/o convertirse en portador (Wenzel y col, 1998).

Se habla de colonización por SAMR, cuando este microorganismo es aislado de una muestra clínica en ausencia de signos de infección; las zonas más frecuentes de colonización son lesiones cutáneas, tracto respiratorio y urinario (Coello y col, 1994). La colonización por SAMR puede persistir por meses o años (Sanford y col, 1994).

Las infecciones causadas por SAMR son las mismas que las de las cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (SAMS). Las más frecuentes son las de heridas quirúrgicas(10-28%), las bacteriemias (10-21%) generalmente a partir de catéter y la neumonía (15-40%), sobretodo en enfermos ventilados (Pujol, 1994), en menor frecuencia se encuentran las infecciones de partes blandas, urinarias, cardiovasculares y osteomielitis (Coello y col, 1994).

Los pacientes infectados con SAMR presentan mayor morbi-mortalidad comparada con los pacientes infectados por cepas SAMS (Romero-Vivas y col, 1995; Pujol y col, 1996; Cosgrove y col, 2003).

Finalmente se considera que una persona es portadora de SAMR cuando este microorganismo se aísla de una localización en la que no suele causar infección. La localización más frecuente es la nariz, donde actúa como reservorio, seguido de la orofaringe. (Coello y col, 1994).

El advenimiento de antibióticos aprobados por la FDA (United States Food and Drug Administration) como el quinupristine/dalfopristine en 1999, linezolid en el 2000 y daptomycin en el 2003, con sus nuevos mecanismos de acción ofrecieron una nueva esperanza para el tratamiento de la infección por MRSA. Sin embargo, *S. aureus* resistente a linezolid y daptomycin ya han sido reportados, reforzando la necesidad de controlar la infección por SAMR en hospitales y en la comunidad (Shittu y col, 2007).

De acuerdo con el National Nosocomial Infection Surveillance System (NNISS) de los Estados Unidos (US), la prevalencia de SAMR se aproxima o excede del 50% en muchos hospitales (Fergie y col, 2001; Frank y col, 1999). Algunos reportes sobre la prevalencia de resistencia a meticilina de *S. aureus* en hospitales de México señalan que ésta es cercana a 50 %. La Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica

(RHOVE) notificó que en el periodo de 1997-2003 *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad (Velázquez Meza y col, 2005).

Hasta 1990 SAMR estaba limitado a un ámbito hospitalario, en la actualidad SAMR está aumentando rápidamente en la comunidad. SAMR-CA es de especial importancia debido a la posibilidad de una propagación descontrolada dentro de las familias y a su propensión a originar infecciones cutáneas y pulmonares de gravedad. (Rojas y col, 2001; Chini y col, 2006; Naimi y col, 2003); contrario a las cepas SAMR adquiridas en hospitales que frecuentemente poseen resistencia a múltiples antibióticos, las cepas aisladas en la comunidad se caracterizan por su tendencia a la susceptibilidad (Martínez y col, 2003; Fey y col, 2003).

1.6 Características genéticas de *S. aureus*

A la fecha la base de datos del genoma de *S. aureus* ha sido completada para 8 cepas; 7 de las cuales ya han sido publicadas; cinco de ellas son resistentes a meticilina: **COL**, **MRSA252**, **MW2**, **N315**, **FPR3757** (USA 300), una cepa es meticilino susceptible: **MSSA476**, una resistente a meticilina y a vancomicina: **Mu50**, y la cepa parental típica de laboratorio: **NCTC 8325**. **Tabla 1** (Shittu y col, 2007).

1.6.1 Genómica comparativa de *S. aureus*

La clasificación filogenética coloca a *S. aureus* en el grupo *Bacillus/Staphylococcus* de acuerdo al 52% de similitud de proteínas codificadas en el genoma de *S. aureus* N315 con *B. subtilis* y *B. halodurans*, típicamente el genoma de *S. aureus* contiene genes constitutivos involucrados en funciones esenciales de la bacteria como replicación de ADN, síntesis de proteínas y metabolismo de carbohidratos. El tamaño del genoma de las 8 cepas de *S. aureus* secuenciadas esta en el rango de 2.8 a 2.9 Mb. **Tabla 1**. Aproximadamente 75% del genoma comprende genes presentes en todas las cepas (Lindsay y col, 2006; Shittu y col, 2007). Las cepas de hospitales N315, Mu50 y las cepas adquiridas en la comunidad MW2 y MSSA476 tienen secuencias idénticas pero difieren en la tipificación de secuencias multilocus (MLST), ST5 y ST1, respectivamente. Las cepas FRP3757 y COL presentaron 678 polimorfismos nucleotídicos únicos (SNPs), confirmando que estas cepas están relacionadas por descendencia vertical. (Diep 2006; Shittu, 2007). La cepa MRSA252 es la más divergente de todas las cepas secuenciadas (ST36) y es representativa de la

clona epidémica EMRSA-16 **Tabla 1** (Lindsay y col, 2004; Diep y col, 2006; Shittu y col, 2007).

1.6.2 Genoma accesorio

El genoma accesorio de *S. aureus* esta constituido por genes con funciones no esenciales como: genes que codifican para: proteínas unidas a la superficie celular, toxinas, exoenzimas, capsula, resistencia a drogas y metales; genes que participan en el metabolismo, usualmente estos genes se encuentran en elementos genéticos móviles (MGEs) que se transfieren horizontalmente entre cepas. Estos elementos incluyen bacteriófagos, islas de patogenicidad, casetes cromosomales, islas genómicas, plásmidos y transposones. **tabla 1** (Pattee y col, 1990; Lindsay y col, 2004; Shittu y col, 2007).

1.6.2.1 Bacteriófagos

La adquisición de bacteriófagos es el método principal de transferencia de genes de resistencia en *S. aureus*. Las cepas SAMR adquiridas en la comunidad MW2 y FPR3757 tienen en sus cromosomas los fagos lamda Sa2mw y Sa3usa, los cuales portan los genes *lukF-PV* y *lukS-PV* que codifican para el factor de virulencia leucocidin Panton Valentine (PVL), que tiene un potente efecto tóxico sobre las células blancas y esta fuertemente asociado con severas formas de neumonía (neumonía necrótica). El fago Sa2usa es muy similar al fago Sa3mw, los dos están integrados en la misma región conservada de 29 pb dentro del cromosoma de *S. aureus*. **Tabla 1** (Diep y col, 2006).

La característica que distingue a la cepa *S. aureus* COL de las demás es la presencia del fago COL 20, al igual que otras cepas de *S. aureus* contiene el fago Sa3; Sa3 es un profago que contiene el gen de la estafiloquinasa (*sak*), el cual es un potente activador de plasminógeno que facilita la diseminación bacteriana mediante la formación de coágulos; en este mismo fago, el genoma de la cepa N315 porta el gen de enterotoxina *sep*, que codifica para una proteína con 77% de similitud a la enterotoxina A y las cepas N315, MRSA252 y FPR3757 poseen el gen *chp* que codifica para una proteína que inhibe la quimiotaxis. **Tabla 1** (Shittu y col, 2007).

Tabla 1. Elementos genéticos móviles en las cepas secuenciadas de *S. aureus*.

	N315	Mu50	MW2	MSSA-476	MRSA-252	COL	FPR3757
Longitud del cromosoma	2,813,641 pb	2,878,084 pb	2,820,462 pb	2,799,802 pb	2,902,802 pb	2,809,422 pb	2,872,769 pb
Bacteriofagos							
Labmda Sa 1	-	-	-	-	-	-	-
Labmda Sa 2	-	-	<i>LukSF-PV</i>	-	-	-	<i>LukSF-PV</i>
Labmda Sa 3	<i>sak, sep, chp</i>	<i>sea, sak</i>	<i>sea, sak, seg2, sek2</i>	<i>sea, sak, seg2, sek2</i>	<i>sea, sak, chp</i>	-	<i>sak, chp</i>
Labmda Sa 4	-	-	-	-	-	-	-
Labmda Sa 5	-	-	-	-	-	Lambda COL	-
Islas genómicas							
<i>vsaa</i>	<i>set, lpl</i>	<i>set, lpl</i>	<i>set, lpl</i>	<i>set, lpl</i>	<i>set, lpl</i>	<i>set, lpl</i>	<i>set, lpl</i>
<i>vsab</i>	<i>Spl, lukDE</i>	<i>Spl, lukDE</i>	<i>Spl, lukDE, bsa</i>	<i>Spl, lukDE, bsa</i>	<i>Spl, hysa</i>	<i>Spl, lukDE, bsa</i>	<i>Spl, lukDE, bsa</i>
Islas de patogenicidad							
Sapl 1	-	-	-	-	-	<i>seb, ear, seg, sek</i>	-
Sapl 2	<i>se1, sec3, tst</i>	<i>se1, sec3, tst</i>	-	-	-	-	-
Sapl 3	-	<i>fhud</i>	<i>ear, se12, sec4</i>	-	-	-	-
Sapl 4	-	-	-	-	-	-	-
Sapl 5	-	-	-	-	-	-	<i>seq2, sek2</i>
Elemento SCCmec							
SCCmec tipo I	-	-	-	-	-	<i>mecA</i>	-
SCCmec tipo II	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	-	-	<i>mecA</i>	-	-
SCCmec tipo IV	-	-	<i>mecA</i>	-	-	-	<i>mecA</i>
plásmidos							
I	<i>ble, kan</i>	<i>ble, kan</i>	-	-	<i>ble, kan</i>	<i>tet</i>	-
II	<i>cadDX,</i>	-	<i>blaZ, cadD</i>	<i>blaZ, cadD</i>	<i>cadAC,</i>	-	<i>tetK</i>
III	-	<i>AacA-aphD,</i>	-	-	-	-	<i>ermc, ileS</i>
Transposones							
Tn554	<i>ermA, spc</i>	<i>ermA, spc</i>	-	-	<i>ermA, spc</i>	-	-
Tn552	-	-	-	-	<i>blaZ</i>	-	-
Tn5801	-	<i>tetM</i>	-	-	-	-	-
Tn916-like	-	-	-	-	-	-	-
Secuencias Multilocus							
ST5	+	+	-	-	-	-	-
ST1	-	-	+	+	-	-	-

Tomada de (Shittu, 2007)

1.6.2.2 Islas genómicas

Dos tipos de islas genómicas (vSaa y vSaβ) han sido identificadas en todos los genomas secuenciados de *S. aureus*. La isla genómica vSaa porta genes de exotoxinas estafilocócicas (*set*) y lipoproteínas (*lpl*) capaces de inducir la producción de citocinas proinflamatorias por células mononucleares periféricas. vSaβ difiere entre cepas por la presencia o ausencia de algunos genes; el grupo de genes vSaβ de las cepas N315, Mu50 y MRSA252 son superantígenos, compuestos por 6 genes de enterotoxinas, mientras que las cepas MW2, MSSA476 y FPR3757 poseen un grupo de genes designado como *bsa*, los cuales codifican para bacteriocinas putativas, la bacteriocina es útil en la competición con otras especies bacterianas para colonización en humanos, la cepa MRSA252 porta el gen hialuronato lyasa (*hysA*). En la **tabla 1** se muestran los genes que contienen las islas genómicas vSaa y vSaβ para cada una de las cepas secuenciadas (Shittu y col, 2007).

1.6.2.3 Islas de patogenicidad.

Las islas de patogenicidad (SaPIs) frecuentemente portan genes de superantígenos como la toxina 1 del síndrome de choque tóxico 1 (*tst*), causante del síndrome de choque tóxico y las enterotoxinas B y C que producen intoxicación alimentaria. Estas islas portan aproximadamente la mitad de las toxinas de *S. aureus* o factores de virulencia y contribuyen a la potencial patogenicidad de *S. aureus*, pueden integrarse en sitios específicos y transferirse horizontalmente con ayuda de bacteriófagos. El genoma de las cepas N315 y Mu50 poseen los genes de superantígenos *se1*, *se3* y *tst*, la cepa Mu50 porta el gen *fhuD* que posiblemente codifica para un transportador de hierro ABC, este transportador podría conferir ventajas selectivas a Mu50 en tejido humano. Por su parte la cepa MSSA476 no tiene una isla de patogenicidad en su genoma mientras que la cepa MRSA252 porta un elemento semejante a SaPIs, SaPI4. Asimismo, una nueva isla de patogenicidad se identificó en FRP3757, SaPI5 y dos enterotoxinas (*seq* y *sek*) que están cercanamente relacionados a los genes observados en la cepa COL. **Tabla 1** (Diep y col, 2004; Shittu y col, 2007).

1.6.2.4 Casete cromosomal estafilocócico (SCC)

SCC_{mec} es un elemento genético móvil, 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_{SCC}*), cerca del origen de replicación de *S. aureus*. El SCC_{mec} está formado por el complejo gen *mec*, el complejo gen *ccr* ("cassette chromosome recombinase") y las regiones J ("junkyard"). El complejo gen *mec* está compuesto de los genes *IS431_{mec}*, *mecA*, y un conjunto de genes reguladores: *mecR1* y *mecI*. La secuencia de inserción *IS431* facilita la adquisición de resistencia a los antibióticos y la resistencia al mercurio. Su movilidad se debe a la presencia de dos genes específicos únicos, *ccrA* y *ccrB* que codifican las llamadas recombinasas del casete cromosómico, estos genes median la integración del elemento SCC_{mec} dentro del cromosoma y su escisión exacta. El resto del elemento SCC_{mec} está compuesto de regiones J 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 beta lactámicos o metales pesados. **Figura 3.** (Shore y col, 2005; Bustos-Martínez y col, 2006; Shittu y col, 2007).

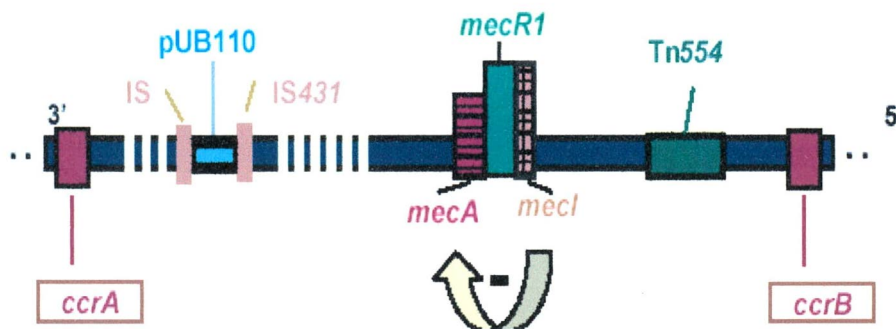


Figura 3. Representación esquemática del SCC_{mec} de la cepa MRSA con los siguientes elementos: región reguladora del gen *mecA* compuesta por los genes *mecI* y *mecR1*, plásmidos (*pUB110*), secuencias de inserción (*IS431*), transposones (*Tn554*) y genes cromosómicos de las recombinasas (*ccrA* y *ccrB*).

Los elementos SCC_{mec} se clasifican en tipos I, II, III, IV, y V, en base a los polimorfismos genéticos en los complejos del 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.

En la tabla 1 se mencionan los tipos de casetes cromosomales para cada una de las cepas secuenciadas (Bustos-Martínez y col, 2006).

Los elementos *SCCmec* difieren uno de otro en su repertorio de determinantes de resistencia a los antibióticos. Las cepas de *S. aureus* intrahospitalarias contienen el *SCCmec* tipo I, II y III, mientras que la mayoría de las cepas de *S. aureus* adquiridas en la comunidad tienen los elementos genéticos *SCCmec* tipo IV y V. El tipo I, contiene el gen *mecA* como único determinante de resistencia, mientras que los tipos II y III contienen múltiples determinantes de resistencia a antibióticos no beta lactámicos y son responsables de el fenotipo de multiresistencia comúnmente encontrado en aislamientos MRSA nosocomiales; los tipos IV y V contienen el gen *mecA* con o sin genes adicionales de resistencia a otros antibióticos explicando la tendencia hacia la susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos en estas cepas (Crawford y col, 2005; Bustos Martínez y col, 2006; Zhang y col, 2005).

Los elementos *SCCmec* tipo IV y V por su tamaño más pequeños son más fácilmente transferidos a otras cepas de *S. aureus* que los elementos más largos *SCCmec* (tipos I, II, y III). Esto trae como consecuencia que se muevan rápidamente entre los diversos ambientes genéticos de las cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina que circulan en la comunidad, aumentando la probabilidad de tener nuevas cepas CA-MRSA (Crawford, 2005 y col, Bustos-Martínez y col, 2006, Shittu y col, 2007).

1.6.2.5 Plásmidos

Los plásmidos de *S.aureus* albergan genes que codifican para resistencia a antibióticos, metales pesados e incluso genes de virulencia como la toxina B exfoliativa y algunos superantígenos. La cepa MW2 tiene un gen de resistencia a penicilina (*blaZ*) y un gen de resistencia a cadmio (*cadD*) en el plásmido pMW2; La cepa N315 en el plásmido pN315 contiene un gen de resistencia a cadmio (*cadD*) y un gen de resistencia a arsenato (*arsRBC*); la cepa Mu50 tiene el plásmido pMu50 que porta el gen de resistencia a aminoglucósidos (*aacaphD*); La cepa MRSA252 en el plásmido pUB110 contiene genes de resistencia a Kanamicina; la cepa COL contiene el gen de resistencia a tetraciclina en el plásmido Pt181. Tres plásmidos fueron identificados en la secuencia del genoma de la cepa FPR3757 incluyen pUSA02, que codifica para resistencia a tetraciclina (*tetK*), el plásmido pUSA03 que porta el gen de resistencia a

eritromicina (*erm*), el tercer plásmido Pusa01 no ha sido identificado. **Tabla 2** (Diep, 2006; Shittu, 2007).

1.6.2.6 Transposones

Los trasposones y secuencias de inserción pueden integrarse en cualquier locus del cromosoma bacteriano y se cree que contribuyen de manera importante a la adaptabilidad de *S. aureus* a ambientes inhóspitos. Tn554 es un transposón que codifica resistencia a espectinomicina y a los antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B. Dos copias de TN554 fueron observadas en el genoma de las cepas N315, Mu50 y MRSA252, otro transposón conjugativo, Tn5801 fue encontrado en la cepa Mu50, el cual porta el gen (*tetM*) que codifica para resistencia a tetraciclina y minociclina, el cromosoma de la cepa MRSA252 contiene el transposón Tn552 que codifica para los genes de resistencia *BlaI*, *BlaR* y *BlaZ* inducidos por β lactamasas. Transposones en el genoma de las cepas MW2 y MSSA476 son escasos. **Tabla 2** (Shittu y col, 2007).

2 Factores de virulencia

S. aureus produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma, y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hiarulonidasas y colagenasas. La función principal de estas proteínas es la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina de pantone valentine (PVL) (Dinges, 2000). *S. aureus* posee otro grupo de proteínas asociadas a la pared celular, que le sirven para adherirse al tejido del huésped como: las proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina, colágeno, coagulasa y la proteína A que esta involucrada en la evasión de la respuesta inmune del huésped. En la **tabla 2** 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.

Tabla 2. Principales factores de virulencia de *S. aureus*

Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglicano	Catalasa	Hemolisina alfa
Proteína A	Hiarulonidasa	Hemolisina beta
Proteínas de unión a fibrinógeno	Lipasas	Hemolisina gama
Proteínas de unión a fibrina	Coagulasa	Hemolisina delta
Proteínas de unión a colágeno	Nucleasas	Leucocidin Pantone Valentine (PVL)
coagulasa	Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas (SE)
	Estafiloquinasa	Toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1)
	Colagenasa	Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)

Tomada de: Bustos-Martínez, 2006

2.1 Producción de factores de virulencia

El crecimiento y la sobrevivencia de una bacteria dependen de su capacidad para adaptarse a cambios ambientales. *S. aureus* ha evolucionado muchos mecanismos para superar estos cambios particularmente en una infección. Una curva de crecimiento de *S. aureus* en condiciones ideales se divide en tres fases: lag, exponencial y estacionaria como lo muestra la **Figura 4**. En la fase lag la bacteria inicia una infección, cuando entra a la fase exponencial se multiplica y sintetiza proteínas de superficie (Proteína A, proteína de unión a fibrinógeno, a fibronectina, a colágeno, a vitronectina, el factor clumping), proteínas esenciales para su crecimiento, adhesión y división celular. Durante la fase pos-exponencial se activan mecanismos que sensan la densidad poblacional, lo que resulta en la producción de toxinas y exoproteínas (hemolisinas alfa, beta, gama, delta, nucleasas, lipasas, enterotoxinas, TSST-1), esto le permite a la bacteria escapar de una infección localizada (absceso). En la fase estacionaria se disemina a nuevos sitios, donde el ciclo es repetido (Harris y col, 2002; Koszcol y col, 2006; Peng, 1998).

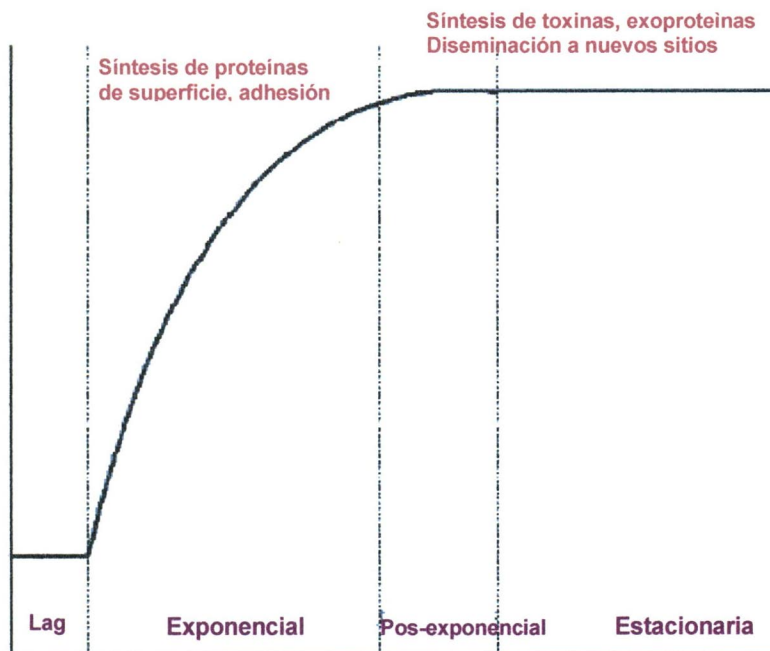


Figura 4. Modelo de la producción de factores de virulencia en las infecciones producidas por *S aureus*. En la fase lag la bacteria inicia una infección. Cuando entra a la fase exponencial, sintetiza proteínas de superficie y proteínas esenciales para crecimiento y división celular. Durante la fase pos exponencial se activan mecanismos que sensan la densidad poblacional, lo que resulta en la producción de toxinas y exoproteínas. En la fase estacionaria se disemina a nuevos sitios, donde el ciclo es repetido (Harris y col, 2002)

2.2 Gen regulador accesorio estafilocócico (Sistema quorum sensing)

S. aureus sintetiza un gran número de proteínas extracelulares que son importantes durante la patogénesis. Estas incluyen varias toxinas citolíticas (α , β , γ , y δ), la toxina I del síndrome de choque tóxico (TSST-1), la leucocidina, la coagulasa, la proteína A y varias enzimas hidrolíticas. En *S. aureus* como en otras bacterias la patogenicidad es multifactorial y los genes que codifican para los factores de virulencia están sujetos a una regulación coordinada.

Estos sistemas regulatorios le permiten a la bacteria responder a cambios en su entorno durante el proceso de infección y adaptar la expresión de los genes de virulencia de una manera apropiada.

QS es un mecanismo de señalización célula- célula que se refiere a la capacidad de la bacteria para responder a moléculas químicas llamadas autoinductores, cuando el autoinductor alcanza una concentración crítica umbral la bacteria lo detecta y responde a esta señal, alterando la expresión de sus genes. El QS fue primero descrito en la

regulación de bioluminiscencia en *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi* (Peng, 1998; Reading, 2006; Koszcol, 2006).

El sistema QS que utiliza *S. aureus* es uno de los más estudiados en organismos gram positivos y está codificado en el locus *agr* (gen regulador accesorio), el cual está constituido por dos transcritos divergentes, RNAII y RNAlII que se originan de los promotores p2 y p3 respectivamente (**Figura 5**). El operon P2 codifica para cuatro proteínas que generan el mecanismo del QS. AgrB es una proteína transmembranal que esta involucrada en: a) El procesamiento del producto de *agrD* a un octapéptido, b) La secreción del péptido autoinducido (AIP) y c) La modificación del AIP a una tiolactona cíclica. AgrA y AgrC forman un sistema regulador de dos componentes en el que AgrC (histidin cinasa), se une al octapéptido AIP, y activa a AgrA el regulador de la respuesta, la activación de AgrA conduce a un aumento de la trascrición de los promotores P2 y P3 en la fase de crecimiento pos-exponencial cuando el péptido señal AIP alcanza la concentración umbral. El incremento en la transcripción del operon P3 resulta en el incremento de RNAlII intracelular. RNA III, es la molécula efectora del sistema *agr* y codifica para la toxina delta hemolisina via el gen *hld*, pero lo más importante es que induce la transcripción (y en algunos casos la traducción) de varios factores de virulencia secretados, incluyendo las hemolisinas (alfa, beta, gama y delta), la toxina-1 del síndrome de choque tóxico, al mismo tiempo que reprime la expresión de varios factores de virulencia asociados a la superficie celular como la proteína A y la coagulasa (Goerke y col, 2000; Gilot y col, 2002; Reading y col, 2006).

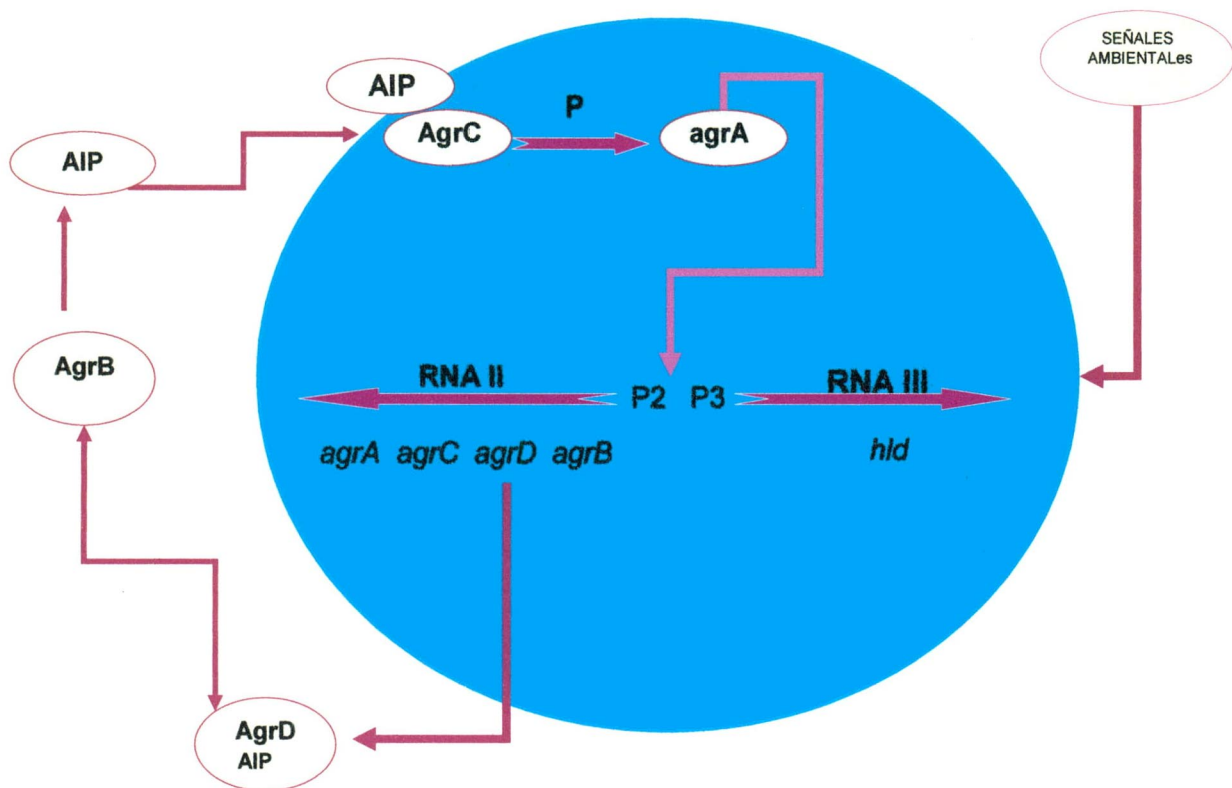


Fig 5 Gen regulador accesorio (*agr*) de *S. aureus*. El operon P2 codifica via RNAII para cuatro proteínas que participan en el mecanismo de señalización que activa el sistema Quorum sensing, mientras que el transcrito del operon P3, RNAIII, actúa como la molécula efectora del locus *agr*. Reguladores adicionales a este sistema como *sarA* pueden influir en la expresión de los genes de virulencia. Estos reguladores adicionales permiten a la bacteria responder a señales ambientales además de la densidad celular bacteriana (Yarwood y col, 2003).

Interesantemente Ji y col (1997) describieron que el AIP producido por una cepa dada de *S. aureus* activa su propio locus *agr* pero puede inactivar la expresión de *agr* de otras cepas. Este fenómeno se debe a polimorfismos en la región variable del locus *agr* que comprende la secuencia nucleotídica codificada por *agrD*, dos terceras partes de la región C terminal de *agrB* y la mitad de la porción N terminal de *agrC*, lo que conduce a la clasificación de aislados de *S. aureus* en 4 grupos. (I-IV). (Fig 6). (Ji y col, 1997; Jarraud y col, 2002; Dufour y col, 2002; Moore y col, 2001; Gilot y col, 2002). Diversos estudios han reportado que grupos específicos *agr* se asocian con diferentes situaciones clínicas por ejemplo, *S. aureus* con resistencia a meticilina adquiridos en la comunidad comúnmente pertenecen al grupo *agr III* y generalmente median enfermedades asociadas a TSST-1 (Naimi y col, 2003, Sakoulas y col, 2002), mientras que los aislados en los nosocomios son altamente enriquecidos en el grupo *agr II*, y se

asocian con enfermedades como impétigo buloso (Sakoulas y col, 2003, Moore y col, 2001). Por su parte, las cepas productoras de exfoliatinas son principalmente del grupo *agr IV* (Jarraud y col, 2002, Dufour y col, 2002), finalmente se ha sugerido una probable asociación entre resistencia a vancomicina y el tipo *agr I* y *II* (Gilot y col, 2002; Reading y col, 2005).

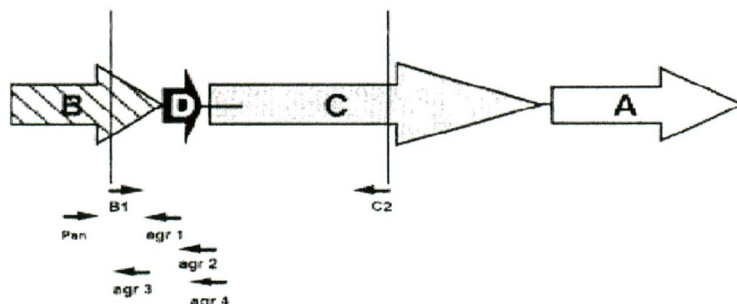


Figura 6. Mapa esquemático del operon *agr* (P2) de *S. aureus*. Los 4 miembros del operon *agr* están representados con la posición de los primers usados en este trabajo. *agrC* y *agrA* codifican para los componentes del sistema de transducción de señales: el receptor histidin proteín- cinasa y el regulador de la respuesta respectivamente. Mientras que *agrB* y *agrD* se combinan para generar el ligando activado para el receptor. Las flechas grandes indican la dirección de la transcripción de cada gen. Las flechas pequeñas indican la posición de los primers usados para amplificar los cuatro tipos *agr*. La longitud de los primers no está a escala pero los extremos 5' están correctamente posicionados (Gilot y col, 2002).

Otra conducta bacteriana regulada por el sistema *agr*- Quórum sensing es la formación de biofilm. El Biofilm son comunidades microbianas embebidas en una matriz polimérica extracelular producidas por ellas mismas. Las bacterias asociadas a biofilm muestran resistencia innata a antibióticos, desinfectantes. Estas propiedades contribuyen a la persistencia de las infecciones por *S. aureus* asociadas a biofilm. Se han descrito dos estadios en la formación de biofilm estafilocócico.

1. Primer estadio involucra la adhesión de las células a la superficie, este estadio en la formación de biofilm probablemente sea mediado por adhesinas asociadas a la pared celular.
2. Segundo estadio en el desarrollo del biofilm incluye la multiplicación celular y la formación de una estructura madura que consiste en muchas capas celulares, este estadio se asocia con la producción de factores extracelulares incluyendo la adhesina polisacárida intercelular componente de la matriz extracelular. (Yarwood y col, 2003; Volper y col, 2004).

2.3 Proteína A

La proteína A (Spa) es la principal proteína de superficie de *S. aureus*, esta presente en más del 90% de las cepas y representa el 7% peso/volumen de la pared celular. Su papel como factor de virulencia en las infecciones por *S. aureus* han sido extensamente estudiadas, tiene la capacidad de unirse a la fracción FC de las inmunoglobulinas G, lo que le permite evadir la respuesta inmune del huésped al evitar la opsonización mediada por las IgGs e inhibir la fagocitosis, se estima que hay 80,000 sitios de unión a IgG por célula de *S. aureus*, se ha demostrado que las cepas de *S. aureus* con un alto contenido de Spa son más resistentes a la fagocitosis que las cepas con menos Spa. (Cheung y col, 1987; 1997; DeDent y col, 2007). En modelos animales, cepas mutantes Spa causan menos infecciones severas que las cepas silvestres (Harris y col, 2000).

2.4 Hemolisinas

Las hemolisinas de *S. aureus* poseen varias actividades biológicas y se clasifican en las siguientes:

- **Alfa hemolisina** tiene efectos letales sobre una amplia variedad de tipos celulares entre ellos los leucocitos polimorfonucleares humanos; además, lisa eritrocitos de varias especies animales. La toxina es dermonecrótica por inoculación subcutánea y es letal para los animales cuando se les inyecta por vía intravenosa. También es una potente neurotoxina. Esta toxina es responsable del halo de eritrocitos hemolisados que se observa alrededor de las colonias que se desarrollan en agar sangre de carnero.
- **Beta hemolisina** es una esfingomielinasa que tiene actividad contra una variedad de células. Es una hemolisina térmica; es decir que sus propiedades hemolíticas son incrementadas por la exposición posterior de los eritrocitos a bajas temperaturas.
- **Gama hemolisina** actúa fundamentalmente como surfactante y también es capaz de activar a la adenilato ciclasa, lo que resulta en la producción de AMP cíclico (mecanismo de acción similar al de la toxina colérica; esta actividad enzimática puede tener importancia en la diarrea observada en asociación con ciertas enfermedades como el síndrome de choque tóxico y la intoxicación alimentaria estafilocócica.

- **Delta hemolisina.** Es un polipéptido de 26 aminoácidos el cual es secretado sin un péptido señal, puede formar canales selectivos en las capas fosfolípicas y es lítico para un amplio rango de células incluyendo neutrófilos, macrófagos y una gran variedad de eritrocitos de mamíferos, así como estructuras subcelulares rodeadas por membrana como esferoplastos y protoplastos. No se sabe si induce la liberación de mediadores de la inflamación. El 97% de las cepas de *S. aureus* produce delta hemolisina. Tiene actividad dermonecrótica y puede ser letal en animales de laboratorio a concentraciones elevadas. Se ha propuesto que la hemolisina delta actúa como surfactante disgregando la membrana celular (Janzon y col, 1990; Bustos-Martínez y col, 2006).

3 Resistencia antibiótica en *S. aureus*

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. La adquisición de esta resistencia se debe principalmente al intercambio de manera horizontal de genes que son transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción. En la **tabla 3** se muestra un resumen de los principales antibióticos a los que se ha encontrado resistencia en cepas de *S. aureus*. Se indican los genes involucrados, los productos del gen y su mecanismo de resistencia (Paulsen y col, 1997; Projan y col, 2000, Bustos-Martínez y col, 2006).

Los antibióticos pueden ejercer su acción de forma bacteriostática (Inhibiendo temporalmente el crecimiento de la bacteria) ó bactericida (destruyendo la viabilidad celular), mediante los siguientes procesos:

A.- Inhibiendo la síntesis de la pared celular, como los beta lactámicos y glicopéptidos, que actúan inhibiendo distintos procesos implicados en la síntesis del peptidoglicano.

B.- Inhibiendo la síntesis proteica, actuando a diferentes niveles en las subunidades ribosomales 30S y 50S, como ocurre con los antibióticos del grupo de los aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, cetólidos, cloranfenicol, ácido fusídico o mupirocina.

C.- Bloqueando la síntesis de los ácidos nucleicos, como sulfonamidas y trimetoprim que actúan inhibiendo el metabolismo del ácido fólico, quinolonas que interfieren en la

síntesis de la replicación del ADN por inhibición del ADN girasa o rifampicina que afecta la transcripción inhibiendo la ARN polimerasa dependiente del ADN (Fuchs y col, 1994; Maranan y col, 1997).

Tabla 3. Principales antibióticos en los que se ha encontrado resistencia en cepas de *S. aureus*

Antimicrobiano	Producto del gen	Genes resistencia	Mecanismo de resistencia
β lactámicos	B lactamasa	<i>blaZ</i>	Hidrólisis enzimática del anillo β lactámico.
	PBPs	Mec A	baja afinidad para PBPs
Amino glucósido	RNAr 30S	<i>aacA-aphD, aadA, aadD, aadD, aphA, aphC, spc, strA.</i>	Modificación por acetiltransferasas, adeniltransferasas o alteración ribosomal de las fosfotransferasas.
Fluoroquinolonas	DNA girasa	<i>gyrA / gyrB norA grlA</i>	Mutaciones en los genes de la DNA girasa, Bombas de expulsión, Mutaciones en el gen de la DNA
Fosfomicina	Síntesis del ácido N-acetil murámico	<i>fosB</i>	Modificación por una glutathione-S-transferasa
Ácido fusídico	Factor de elongación G	<i>fusA/fusB</i>	Alteración en el factor de elongación G/disminución de la permeabilidad
Glicopéptidos	Complejos D-Ala-D-Ala	desconocido	Secuestro por la pared celular
Macrólidos, lincosamidas	RNAr 50s	<i>ermA, ermB, ermC, msrA</i>	Metilación del RNAr, Bombas de expulsión
Rifampicina	Subunidad β de la RNA polimerasa	<i>rif</i>	Alteraciones en la RNA polimerasa
Sulfonamidas	Síntesis de ácido tetrahidrofólico	<i>sulA</i>	Sobreproducción de ácido p-aminobenzoico
Tetraciclinas	RNAr 30s	<i>tetA(K)/ tetA(L) tetA(M)</i>	Bombas de expulsión Protección ribosomal
Trimetoprim	Síntesis del ácido tetrahidrofólico	<i>dhfrA</i>	Bypass por una dehidrofolato reductasa

Paulse, 1997; Projan, 2000; Bustos-Martinez, 2006

3.1 Principales grupos de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones producidas por *S. aureus*

Los **beta lactámicos** son los antibacterianos más utilizados, tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario debido a sus cualidades, las cuales son: actividad bactericida, eficacia, escasa toxicidad y amplio margen terapéutico. Son ácidos orgánicos, la mayoría solubles en agua y se ionizan en solución, hecho que dificulta su difusión a través de las membranas. Actúan sobre el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, inhibiendo la última etapa de su síntesis e induciendo su destrucción, para ello deben llegar a su blanco de acción, las PBPs por sus siglas en inglés *penicillin binding proteins* o proteínas que se unen a las penicilinas. La inactivación de las PBPs se hace por formación de complejos covalentes con los , por lo tanto el efecto de un determinado β lactámico depende de la afinidad que tenga por las diferentes PBPs, ya que cada β lactámico tiene una afinidad máxima para una PBP concreta. Esta afinidad se define a concentraciones bajas de antibióticos, puesto que si se aumenta la concentración pueden ser inhibidas otras PBPs (Sánchez, 2004; Nuñez, 2006).

Los **macrólidos, lincosamidas y estreptograminas** son antibióticos muy usados en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas. Actúan a nivel del RNA ribosomal 23S de la subunidad 50S del ribosoma. Inhiben la fase de elongación de la síntesis proteica por bloqueo de la translocación o de la transferencia peptídica (Sánchez, 2004).

Los **cetólidos** son derivados de la eritromicina A, macrólido de 14 átomos de carbono. El primer cetólido comercializado, la telitromicina, actúa por inhibición de ensamblaje de las subunidades 30S y 50S y por bloqueo de los péptidos, por lo que inhibe igualmente la síntesis de proteínas (Fluit y col, 2001).

Los **glucopéptidos** como la vancomicina y la teicoplanina, ambos poseen una excelente actividad frente a bacterias gram positivas. El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, evitando la polimerización del peptidoglicano mediante la formación de un complejo con el precursor D-alanil D-alanina. Secundariamente alteran la permeabilidad celular y la síntesis de RNA, ejercen una rápida acción bactericida, pero solo sobre bacterias en crecimiento activo. La vancomicina se une a los monómeros de mureína (D-Ala-D-Ala) anclados en la membrana citoplasmática .y esto evita que el monómero de mureína sea

incorporado en la cadena nascente del peptidoglicano, (Reynolds y col, 2003; Baddour y col, 2006, Reipert y col, 2003).

3.2 Evolución de la resistencia antibiótica en *S. aureus*

S. aureus fue el primer microorganismo en poner de manifiesto resistencia a los antimicrobianos y ser capaz de desarrollar mecanismos intrínsecos o adquiridos que le han ido confiriendo resistencia a la mayoría de los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de las infecciones estafilocócicas.

La introducción de la penicilina a principios de los años 40 como tratamiento en las infecciones causadas por *S. aureus* abatió de manera importante las enfermedades ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, un año después de su utilización ya se tenían cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina, para 1946, en Inglaterra se observó que aproximadamente el 60% de los aislamientos eran resistentes a la penicilina. Durante los años 50 se diseminaron las cepas resistentes a penicilina, así como a los antibióticos recién introducidos: eritromicina, cloranfenicol, estreptomicina y tetraciclina. Actualmente más del 80% de las cepas de *S. aureus* aisladas de hospitales son resistentes a la penicilina (Barber y col, 1947; Shanson y col, 1981; Bustos-Martínez y col, 2006).

Debido a la resistencia a la penicilina de las cepas de *S. aureus*, en 1959 se introdujo la meticilina, una penicilina, semisintética que resiste la acción de la betalactamasa que degrada la penicilina; ésta nueva droga permitió volver a tener un control sobre las infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, esta nueva situación duro poco, ya que en 1961 aparecen las primeras cepas resistentes a meticilina aisladas en Inglaterra por Jevons y Knox en 1961. Dos años después aparece el primer brote epidémico de infección nosocomial por SAMR en el Reino Unido (Stewart, 1963), durante los años 70s SAMR disminuyo casi hasta cero, para reaparecer a mediados de la década de los 80s. Desde entonces se ha convertido en un problema en hospitales, alcanzando hasta el 50% de los aislamientos y diseminándose a la comunidad (Rodríguez y col, 2005). Los aislamientos de SAMR presentan resistencia intrínseca a todos los beta lactámicos, incluidas las cefalosporinas y carbapenemos (Schaeffler, 1989). En la actualidad más del 90% de SAMR presentan resistencia a la mayoría de los antibióticos utilizados para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*. En la última década se han documentado casos de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a

vancomicina (Hiramatsu, 1997) más recientemente se han descrito casos en USA de cepas de *S. aureus* con alto nivel de resistencia a vancomicina (CDC, 2002, 2004; Chang y col, 2003; Tenover y col, 2004).

3.3 Mecanismos de resistencia

3.3.1 Resistencia antibióticos beta lactámicos

a) Generalidades penicilinas semisintéticas.

Los antibióticos beta lactámicos constituyen uno de los grupos más importantes dentro de la terapéutica antiinfecciosa puesto que continúan siendo el tratamiento de primera elección en numerosos procesos infecciosos. Su descubrimiento se debe a Fleming quien en 1928 denominó penicilina a la sustancia producida por un hongo, *penicillium notatum*, que provocaba la lisis de diferentes especies de *S. aureus* (Fleming, 1929).

La familia de los antibióticos beta lactámicos se define químicamente por la presencia de un anillo betalactámico, que en si mismo carece de actividad antimicrobiana necesitando ser activado por otros radicales para que pueda unirse a las dianas donde ejerce su acción (PBPs). La naturaleza de los radicales esenciales que se unen al anillo betalactámico define las diferentes clases o grupos de antibióticos beta lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactames, carbapenemes e inhibidores de betalactamasas) (Neuhaus, 1992).

Las penicilinas son un grupo de antibióticos de origen natural semisintético, que tienen un núcleo base común que es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). Posee una cadena lateral (R) en la posición 6 que varía de unas penicilinas a otras y es la que define sus propiedades farmacocinéticas, el espectro, la actividad y la resistencia a betalactamasas.

La primera penicilina natural. La penicilina G o benzilpenicilina, se obtuvo en 1929 del hongo *Penicillium chrysogenum* y se introduce de forma terapéutica en la década de los 40 para el tratamiento de las infecciones estafilocócicas (Abraham, 1941); pero su actividad fue rápidamente anulada por la capacidad de los estafilococos para producir penicilinasas o betalactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico inactivando los antibióticos beta lactámicos (Kirby, 1944).

Con objeto de evitar la acción degradativa de la penicilinasas, se modificó la estructura química del 6-APA mediante la agregación de distintas cadenas laterales, lo que permitió desarrollar un nuevo grupo de antibióticos beta lactámicos, las penicilinas

semisintéticas. La primera de este grupo es la dimetoxibenzil penicilina o meticilina cuya cadena lateral la hace resistente a la acción hidrolítica de la betalactamasa estafilocócica. Presenta el inconveniente de que es inestable al pH gástrico y requiere administración parenteral, por lo que posteriormente se fueron sintetizando nuevos compuestos ácidos estables como la oxacilina, cloxacilina y flucloxacilina. Ahora, la meticilina ya no es un agente de elección en el manejo clínico ni para evaluar la susceptibilidad de *S. aureus*. Sin embargo, el acrónimo MRSA es aún usado por la mayoría para describir estos aislamientos.

b) Mecanismo de resistencia a penicilina: la resistencia a las penicilinas se debe a la producción de una penicilinas plasmídica, inducible que inactiva la penicilina G, las carboxipenicilinas y ureidopenicilinas. El mecanismo de inducción consiste en que la penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína antirrepresora que, al inhibir el gen represor de la β lactamasa (*blaI*) aumenta la síntesis de β lactamasa (Imsade, 1978). Esta penicilinas es inactivada por los inhibidores de β lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam). Las cefalosporinas no son hidrolizadas.

c) Mecanismo de resistencia a meticilina: El mecanismo de resistencia a meticilina fue descubierto en 1981 con la identificación de alteraciones en la afinidad de las proteínas que se unen a las penicilinas o PBPs en SAMR (Hayes y col, 1981; Hartman y col, 1981). La meticilina es una penicilina semisintética que resiste la acción de la beta lactamasa que degrada la penicilina. La resistencia a meticilina implica resistencia intrínseca a todos los beta lactámicos incluidas cefalosporinas y carbapenemes.

Las PBPs son enzimas localizadas en la membrana bacteriana que catalizan las reacciones de transpeptidación del peptidoglicano durante la síntesis de la pared celular, y son inhibidas por los beta lactámicos, incluida la meticilina. Las cepas SAMR además de sintetizar estas proteínas se caracterizan por desarrollar una PBP de baja afinidad por los antibióticos beta lactámicos denominada PBP2A o PBP2'; esto permite que cuando las PBPs están inhibidas por la presencia de meticilina, la PBP2A continúa activa manteniendo la síntesis de la pared celular (De Lencastre, 1991). Asimismo, la PBP2A difiere de las PBPs en que en su sitio activo se bloquea la unión a cualquier β lactámico, permitiendo que la reacción de transpeptidación se lleve a cabo (Lim, 2002).

El determinante genético de resistencia a meticilina es el gene *mecA*, de localización cromosómica, que codifica la síntesis de la PBP2A (Hartman, 1984; Ubukata, 1985; Chambers 1985). Esta secuencia cuenta con dos genes reguladores: el gen *mecR1* o gene regulador de la señal de transducción del gene *mecA* y el gene *MecI*, que codifica la proteína represora de la transcripción del gene *mecA* (De Lencastre, 1994). La transcripción del gen *mecA* se produce cuando el β lactámico llega a la célula y se une al receptor dominio de unión a penicilina de la membrana citoplasmática codificado por el gene *mecR1*, desencadenando una señal que induce a la proteasa autocatalítica a unirse a *mecI*, el cual esta bloqueando la región operadora de *mecA*, de esta manera queda libre el operador de *mecA* siendo posible la expresión de PBP2A (Hiramatsu, 2001).

3.3.2 Resistencia a macrólidos- lincosamidas-estreptograminas-cetólidos (MLSK)

a) Características generales del grupo MLSK

Los macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y cetólidos constituyen el grupo de antibióticos denominado MLSK. A pesar de tener estructuras químicas diferentes, poseen mecanismos de acción y de resistencia e indicaciones semejantes.

Los macrólidos son antibióticos de naturaleza lipídica obtenidos del género *Streptomyces* y *Micromonospora*. Su estructura química consiste en un anillo lactónico macrocíclico unido por un enlace glucosídico a deoxiazúcares aminados. El número de átomos de carbono del anillo lactónico permite clasificar a los macrólidos en tres grupos: macrólidos de 14 átomos (Eritromicina) de 15 átomos (Claritromicina, azitromicina), de 16 átomos (Espiramicina, Josamicina). El antibiótico tipo es la eritromicina. Esta formada por una mezcla de compuestos, de los cuales la eritromicina A es el más representativo.

Las lincosamidas incluyen dos antibióticos: la lincomicina y su derivado clorado, la clindamicina se utiliza en clínica por su mejor biodisponibilidad y mayor actividad. Desde el punto de vista químico están constituidos por un ácido aminado y un azúcar unidos por una amida.

Las estreptograminas son antibióticos producidos por diferentes especies del género *Streptomyces* los dos componentes son la quinupristina (Estreptogramina B) y la Dalfopristina (Estreptogramina A), derivados solubles semisintéticos. Químicamente no

están relacionadas pero actúan de manera sinérgica. La Estreptogramina A es una macrolactona poliinsaturada y la Estreptogramina B un hexapéptido cíclico (Nadler, 1999).

Los cetólidos son una nueva familia de antibióticos semisintéticos derivados de eritromicina A que se ha sustituido uno de los azúcares por un grupo ceto. La pérdida del azúcar determina que la molécula sea menos sensible al pH ácido y al desarrollo de los mecanismos de resistencia bacteriana (Balfour, 2001).

b) Mecanismos de resistencia del grupo MLSK

La resistencia en este grupo de antibióticos puede producirse por cuatro mecanismos:

1) Modificación y alteración de la diana (RNA ribosomal 23S): La acción de metilasas codificadas por genes *erm* (A, B y C y en menor grado F e Y) son el mecanismo de resistencia más frecuente.

Los genes *ermA* y *ermB* son cromosómicos y se encuentran en los transposones, Tn554 y Tn551 respectivamente, mientras que el gen *ermC* se localiza en un plásmido, pMS97, que está presente en *S. aureus* (Matsuoka, 1998). La presencia de genes *erm* confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B constituyendo el fenotipo MLSB constitutivo o inducible. En el fenotipo MLSB constitutivo la cepa es resistente a todos los macrólidos (con anillo de 14, 15 o 16 átomos), a las lincosamidas a los cetólidos y las estreptograminas B. Las estreptograminas A no están afectadas por lo que la asociación de ambos permanece activa. El fenotipo MLSB inducible es el más frecuente, la resistencia afecta a macrólidos de 14 y 15 átomos, pero no a los de 16 átomos, lincosamidas, cetólidos y estreptograminas.

2) Expulsión activa del antimicrobiano "bombas de flujo": codificada por los genes *msrA*, *msrB*, *erpA*, *vgaA* y *vgaB*. Los genes *msrA* confieren resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos y a estreptograminas dando lugar al fenotipo MSB. Estos genes se encuentran en un plásmido, Pul5050 (Ross, 1990). Cuando la resistencia a eritromicina es mediada por *msrA*, la resistencia a clindamicina no se produce.

3) Inactivación del antibiótico: genes *InuA*, *vatA*, *vatB*, *vatC*, *vgbA*, *vgbB*. El gen *InuA* confiere resistencia a lincosamidas y los genes *vat* y *vgb* a estreptograminas.

4) Modificación de la diana por mutación del RNA ribosomal 23S y/o de proteínas ribosomales.

Estos últimos mecanismos de resistencia son muy poco frecuentes (Leclercq, 1991; Leclercq, 2002).

3.3.3 Resistencia gluco péptidos

a) Características generales de los gluco péptidos

Los gluco péptidos son fármacos de espectro reducido, químicamente no se relacionan con ningún otro grupo de antibióticos. Son moléculas de estructura compleja que contienen un heptapéptido como estructura central. Sus diferencias residen en el primer y tercer aminoácido de la estructura heptapéptídica, los otros 5 aminoácidos son aromáticos y comunes a todos los gluco péptidos (Pigrau, 2003). Los principales componentes que integran este grupo son vancomicina y teicoplanina.

La vancomicina producida por *Streptomyces orientales*, fue aislada en 1950 pero hasta 1958 fue introducida en la práctica clínica. Su uso estuvo limitado en el pasado, porque presentaba importantes efectos tóxicos. Posteriormente se redujó la toxicidad de la vancomicina y se introdujó en el mercado un segundo glicopéptido, la teicoplanina que posee escasos efectos tóxicos y es de fácil administración. Ambos fármacos presentan una actividad similar frente a *S. aureus*.

b) *S. aureus* con resistencia heterogénea a vancomicina (hetero-VISA) y *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA)

La vancomicina ha sido considerado el principal soporte de tratamiento para cepas de *S. aureus* resistente a meticilina durante más de 40 años, pero su uso excesivo ha llevado a la aparición de cepas SAMR intermedias a vancomicina (VISA) y resistentes a vancomicina (VRSA) (Appelbaum y col, 2006).

En 1996 en Japón se aisló la primera cepa de *S. aureus* con heterorresistencia a Vancomicina (hetero-VISA), en un paciente con infección por SAMR que no respondía al tratamiento con vancomicina, (Hiramatsu 1997); la cepa hetero-VISA (Mu3), que presenta una CMI $\leq 4\mu\text{g/ml}$; pero posee subpoblaciones que pueden crecer en presencia de concentraciones $\geq 4\mu\text{g/ml}$ de vancomicina (Hiramatsu 1998). La importancia potencial de las cepas hetero- VISA es que pueden estar asociadas con tratamientos fallidos con vancomicina y ser precursoras de cepas con resistencia intermedia a vancomicina (VISA). La evidencia de que una cepa hetero-VISA evoluciona a VISA durante el curso de una infección fue descrita en Nueva York

(Sieradzki, 1999). El significado clínico de la heterorresistencia esta todavía en investigación.

En mayo de 1996 en Japón, un niño de 4 meses que había sido sometido a cirugía cardiaca desarrolló una infección de la herida quirúrgica con presencia de SAMR, la evolución clínica fue desfavorable a pesar del correcto tratamiento con vancomicina. Esta cepa de SAMR con resistencia intermedia a vancomicina (VISA), denominada Mu50 presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) a vancomicina de 8µg/ml y carecía de los genes *van A* y *van B*, por lo que se sospechó que se trataba de un mecanismo de resistencia intrínseco, por un incremento en la síntesis de la pared celular. Este aislamiento produjo un gran impacto en el mundo científico por tratarse de la primera cepa clínica descrita con estas características (Hiramatsu y col, 1997).

Posteriormente, en julio de 1997 se aisló en Michigan una nueva cepa VISA en un paciente sometido a diálisis peritoneal ambulatoria que sufrió una peritonitis (CDC, 1997). Un mes más tarde una tercera cepa VISA se identificó en la sangre de un paciente de New Jersey (CDC, 1997). Sucesivamente se fueron publicando casos similares en diferentes países del mundo (Smith, 1999; Ariza, 1999) lo que implica posibilidad de diseminación de estas cepas con el consiguiente problema terapéutico (Liñares, 2001) y su eventual escalada hacia una resistencia a vancomicina.

La resistencia a vancomicina (CMI \geq 32 µg/ml) en *S. aureus* es muy rara, por el contrario las cepas VISA y/o hVISA son más frecuentes, siendo la prevalencia de hVISA más alta que la de VISA. La prevalencia de hVISA en el mundo oscila entre 0.5-20% de SAMR (Wals, 2002). En Europa se encuentra entre 0.5%, siendo más frecuente en determinados países como Francia (Reverdi, 2001), Alemania (Geisel, 1999), Italia (Marchese, 2000), España (Ariza, 1999) y Reino Unido (Auckken, 2000); En Asia oscila entre 0-20%, destacando en Hong Kong (Wong, 1999), Japón (Hiramatsu y col, 1999; Furuya y col, 2001) y Korea (Kim y col, 2002); En Sud-América la prevalencia es del 3%, en Brasil y en Norte América oscila entre 0-3% (Hubert y col, 1999).

c) *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA)

En 1992 Noble y colaboradores reportaron la transferencia *in vitro* sobre la piel de un ratón de los genes de resistencia a vancomicina de una cepa de *Enterococcus faecalis* a *S. aureus*, confiriéndole resistencia total. Desde entonces se ha postulado que puede ocurrir transferencia de material genético si los dos microorganismos comparten

el mismo nicho ecológico. En E.U se aisló la cepa VRSA en cuatro casos, con CMI_s de 1024, 32, 64 y 256 µg/ml respectivamente. Las cuatro cepas presentaron resistencia completa a la vancomicina, diferente mecanismo de transmisión y no tenían ninguna relación epidemiológica (Rudrick y col, 2005). El primer aislamiento fue descrito en Michigan en junio del 2002 y se aisló en un catéter de un paciente de 40 años con diabetes, enfermedad vascular y falla renal crónica. Previamente el paciente había sido tratado con vancomicina por una úlcera crónica en el pie. En el mismo sitio de la infección se aisló también una cepa de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (CDC, 2002). El segundo aislamiento de otra cepa VRSA se aisló tres meses más tarde en Pensilvania (EUA) procedente de una úlcera crónica en el pie de un paciente de 70 años con obesidad mórbida hipertensiva y una úlcera crónica en el tobillo, en la cual se había aislado previamente las cepas MRSA y VRE, sorprendentemente el paciente no había sido hospitalizado ni había recibido tratamiento con vancomicina desde hacia 5 años (CDC, 2002; Tenover y col, 2004; Chang y col, 2003). El tercer aislamiento la cepa VRSA fue en la ciudad de Nueva York, en marzo del 2004 en la orina de un paciente ingresado en la unidad de cuidados intensivos (CDC, 2004). En este paciente también se aislaron cepas de enterococos resistentes a vancomicina. Una cuarta cepa de VRSA ha sido descrita en marzo del 2005 en Michigan, aislada de una herida gangrenosa de un paciente de 78 años con historia previa de diabetes, enfermedad vascular y afectación renal. Anteriormente había recibido tratamiento con vancomicina debido a un reemplazamiento valvular. Aunque en la herida también se aisló *E. faecalis* sensible a vancomicina, en el screening de frotis rectal se halló un *E. faecalis* resistente a vancomicina (Rudrick y col, 2005). La característica común de los cuatro aislamientos es la presencia del fenotipo van A que confiere resistencia a vancomicina mediante la sustitución del extremo D-Ala –D-Ala del monómero de peptidoglicano por D-ALA-D-Lactato cuya afinidad por el antibiótico es 1000 veces menor que la del monómero silvestre. El análisis molecular del primer aislamiento reveló la presencia de un plásmido conjugativo en el cual estaba integrado el gen vanA con 100% de homología con la secuencia prototipo aislada en la cepa VRE, el transposón Tn1546. Demostrándose así la transferencia interespecies de este determinante de resistencia (Rodríguez y col, 2005). Más recientemente se ha reportado resistencia a vancomicina en Brazil y Jordan. (Krishna-Tiwari y col, 2006).

d) Mecanismo de resistencia a vancomicina

El mecanismo de resistencia a vancomicina ha sido estudiado extensamente en la primera cepa de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA), denominada Mu50, las pruebas bioquímicas y la microscopía electrónica indican que esta cepa produce mayores cantidades de peptidoglicano, debido a la mayor incorporación de glucosamina, mayor concentración de monómeros de peptidoglicano y mayor producción de PBP2 a, por lo que su pared celular es más gruesa (entre 30 y 40 capas de peptidoglicano), como consecuencia un número mayor de moléculas de vancomicina quedan atrapadas antes de llegar a la membrana citoplasmática, donde actúan las transglucosilasas, que es el blanco de acción de la vancomicina. Este mecanismo se ha definido como atrapamiento de afinidad. Adicionalmente se ha visto que la estructura externa de la pared celular se distorsiona por las moléculas secuestradas de vancomicina, lo que impide aún más la entrada de otras moléculas del antibiótico, este hallazgo no se limita a la cepa Mu50 (Rodríguez y col, 2005; Cui L y col, 2003). Además del engrosamiento de la pared celular, se ha observado una disminución en el grado de entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano, lo cuál aumenta el número de D-Ala-D-Ala libres en las capas externas de la pared y por lo tanto más antibiótico puede ser atrapado antes de llegar al sitio de acción (Rodríguez, 2005). Estos fenotipos de bajo nivel de resistencia a glicopéptidos no involucran los genes *van* que confieren resistencia a vancomicina en enterococos (Jarraud y col, 2002). por otro lado la revisión de casos clínicos de varios pacientes con *S. aureus* nivel intermedio de resistencia (VISA), reveló que además de una exposición prolongada a vancomicina, la mayoría de estos pacientes tenía infecciones originadas por aparatos biomédicos, como válvulas artificiales de corazón, catéteres venosos etc. (Gilot y col, 2002, Yarwood y col, 2003).

II Estado del arte

Históricamente al sistema *agr* Quorum sensing se le ha asignado un papel central en el modelo de patogénesis de *S. aureus*. Otros reguladores de virulencia identificados en *S. aureus* responden a señales ambientales además de la densidad celular bacteriana (Novick y col, 2003).

Entre estos reguladores de dos componentes se encuentran: **SaeRS**, involucrado en la regulación de factores de virulencia. Se ha propuesto aunque no ha sido confirmado, que el locus *Sae* responde a señales ambientales, que incluyen concentraciones altas de sal, bajo pH, y concentraciones subinhibitorias de antibióticos. **ArIRS** es otro regulador de dos componentes; reprime la producción de hemolisinas y exoenzimas. *ArIRS* también regula la actividad autocatalítica así como la bomba de eflujo multidrogas *NorA* de *S. aureus*. Estos datos sugieren que bajo ciertas condiciones *agr* puede influenciar la resistencia a antibióticos. Un tercer sistema de dos componentes es **SrrAB**, identificado más recientemente, inhibe la expresión de *RNAIII* y puede ser reprimido por *agr*. Mutantes de *srrAB* son incapaces de crecer bajo condiciones anaerobias, *srrAB* regula genes involucrados en metabolismo. La señal para este sistema puede ser una menaquinona, un intermediario en la vía respiratoria oxidativa. **SrrAB** puede ser un enlace entre el metabolismo en la célula y la respuesta quórum sensing. Otra familia de reguladores de virulencia estafilocócicos son las proteínas de unión a DNA, que incluyen el regulador accesorio estafilocócico (**SarA**) por sus siglas en inglés y sus homólogos. Se ha reportado que **sarA** es requerido para la transcripción de *agr*, afecta la expresión de muchos genes de virulencia, algunas veces actúa independientemente de *agr* disminuyendo la expresión de varias exoproteínas. otros reguladores transcripcionales, quienes interactúan con el sistema *agr* son el represor de toxinas (**Rot**) y el factor alternativo **sigma β** ambos han demostrado que afectan la expresión de muchos genes asociados a virulencia. **Rot** parece que tiene actividad homologa a *agr*, el factor **sigma β**, el cual responde a estrés ambiental, actúa inversamente a *agr*, ya que incrementa la expresión de algunas exoproteínas en la fase de crecimiento temprano (Abdelnour y col, 1993; Bischoff y col, 2001; Yarwood y col, 2003).

Se ha demostrado que la resistencia a beta lactámicos en *S. aureus* parece involucrar una respuesta a estrés, donde el regulón *VraSR* tiene un papel crítico, como sistema

centinela capaz de sensor, la perturbación de la síntesis de la pared celular e inducir la expresión de genes esenciales para la generación de un fenotipo altamente resistente (Belcheva, 2008). Estudios de proteómica han revelado que unas proteínas son producidas en cantidades incrementadas cuando *S. aureus* es retado con antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular y estudios de perfil transcripcional muestran sobre-expresión de varios genes involucrados en metabolismo y respuesta al estrés. Esta respuesta puede representar una característica transcripcional de un estímulo de pared celular inducido en respuesta a agentes activos de la pared celular, del que VraSR forma parte (Belcheva y col, 2008; Yin y col, 2006).

III Antecedentes particulares del proyecto

Desde la aparición en 1997 del fenotipo VISA y hetero VISA, estas cepas han sido extensamente estudiadas, el fenotipo VISA se caracteriza por pérdida de función de *agr*, polimorfismo *agr* II y auto lisis anormal, lo que sugiere que las clonas con el polimorfismo *agr* II tienen ventaja, cuando están bajo presión selectiva a glicopéptidos (Jarraud y col, 2002, Moore y col, 2001). La participación de *agr* en la resistencia a vancomicina quedó demostrada cuando se aisló una cepa de *S. aureus* de un paciente antes de iniciar el tratamiento con vancomicina (A5937), y 60 días después del tratamiento (A5940), los aislados A5937 y A5940 fueron indistinguibles por electroforesis en campos pulsados (PFGE), el desarrollo de heterorresistencia a vancomicina mostró pérdida de expresión de delta hemolisinas, la secuencia del gen *agr* reveló una mutación sin sentido en *agrA* en la cepa hetero GISA A5940 no vista en la A5937, esta mutación resultó en la delección de 76 aa en el extremo C Terminal de *agrA* y presumiblemente pérdida de función de *agr* (Sakoulas, 2002). Ver **figura 7**. Por lo que la pérdida de función del gene *agr* pudiera ser un paso temprano al desarrollo de tolerancia a vancomicina y la razón por la cual se presentan fallas en el tratamiento en pacientes con infección persistente. El gen *agr* también regula positivamente la expresión de muchas hidrolasas de mureína involucradas en auto lisis, por lo que defectos en este operon pueden estar involucrados en el desarrollo de auto lisis deficiente en el fenotipo VISA. La pérdida de función de *agr* pudiera ser simplemente un marcador para otros defectos genéticos no definidos que afectan las vías autolíticas. (Jarraud y col 2002, Moore y col 2001).

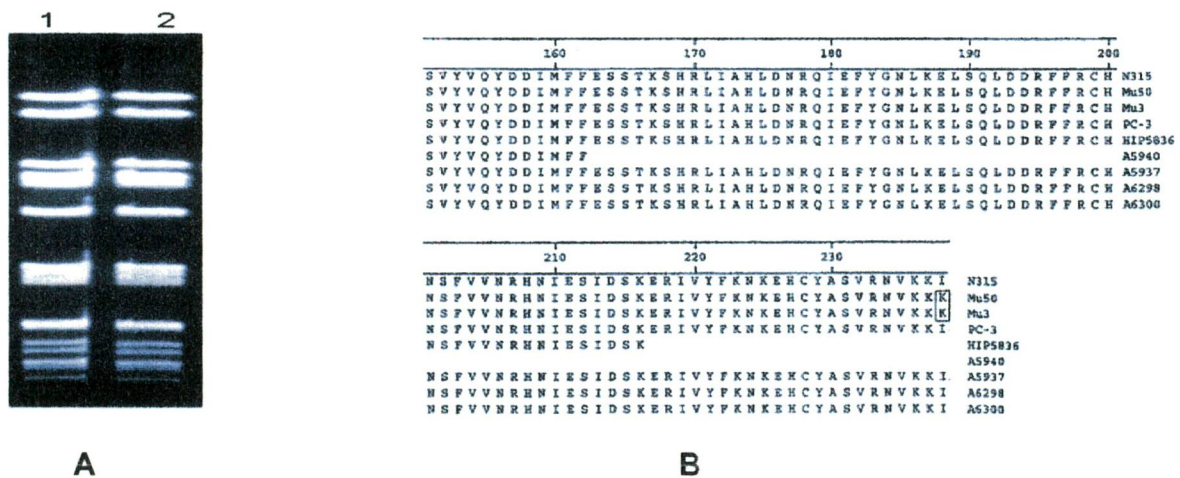


Figura 7. A) PGFE de DNA genómico restringido con *SMA1* de dos cepas de *S. aureus* aisladas del mismo paciente. Carril 1 antes del tratamiento con vancomicina; carril 2 después de 50 días de tratamiento con vancomicina. B) Comparación de las secuencia traducidas de la proteína *AgrA* de aislados VISA y hetero-VISA con las dos cepas aisladas del mismo paciente antes y después del tratamiento con vancomicina (Sakoulas y col, 2002).

IV Importancia de continuar el estudio

El excesivo uso de antibióticos ha conducido a la selección de cepas de *S. aureus* multirresistentes y la resistencia a vancomicina en aislados de *S. aureus* en hospitales de E. U y Japon es alarmante.

Conocer el perfil de expresión de RNA III en cepas de *S. aureus* multirresistentes podría indicar cual es el papel de los mecanismos de represión y activación relacionados al QS en la asociación de la virulencia con la resistencia bacteriana.

V Hipótesis

La multiresistencia a tres o más antibióticos modifica la expresión de la molécula efectora RNAIII codificada en el locus *agr* de cepas de *S. aureus* intrahospitalarios.

VI Objetivos

Objetivo General:

Determinar si la multiresistencia afecta la expresión de la molécula RNA III en aislados intrahospitalarios de *S. aureus*.

Objetivos Particulares:

- 1) Establecer la susceptibilidad a diversos antibióticos en las cepas de *S. aureus* de origen nosocomial.
- 2) Correlacionar el genotipo *agr* con la multiresistencia.
- 3) Evaluar la expresión de la molécula RNA III vía los genes *hld* y *spa* en aislados clínicos de *S. aureus* multirresistentes y sensibles, derivados de procesos infecciosos invasivos.
- 4) Evidenciar la expresión de la proteína de secreción delta-hemolisina

VII Estrategia Experimental

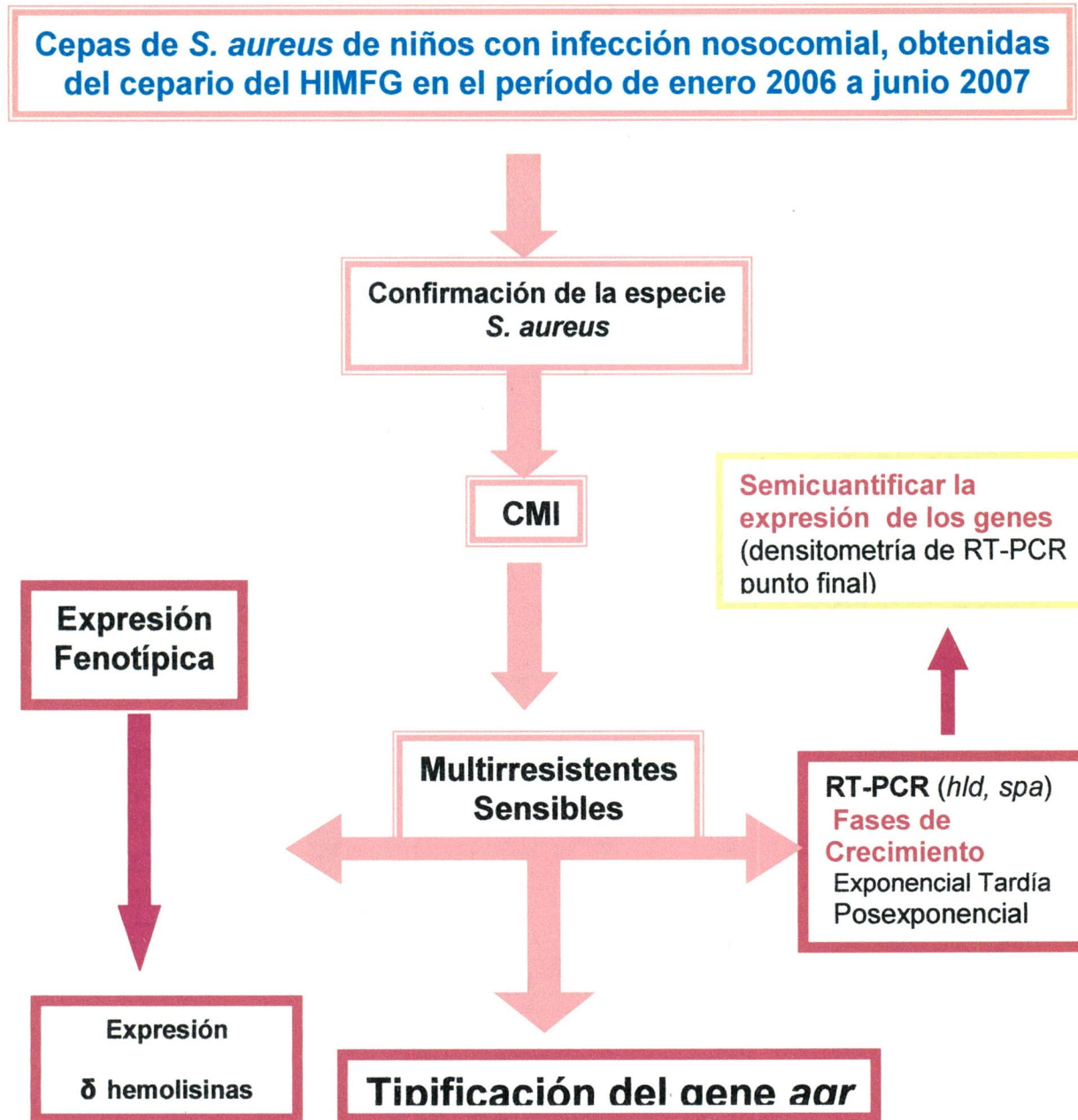


Figura 8. Estrategia experimental

VIII Material y Métodos

1 Diseño del estudio

1.1 Universo de estudio

La población a estudiar estuvo constituida por 33 cepas de *S. aureus* aisladas de niños con procesos invasores, dichas cepas fueron obtenidas del cepario del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), colectadas a partir de enero del 2006 a junio del 2007.

1.2 Definición de variables

Infección Intrahospitalaria (IIH): Para determinar el origen nosocomial de los aislamientos se utilizan los criterios de la Norma Oficial Mexicana para el control y prevención de infecciones nosocomiales. Se considerarán de origen nosocomial a las bacterias aisladas de pacientes que adquieren una infección después de 72 horas de haber ingresado al hospital y que no se encontraban en periodo de incubación al momento del ingreso.

- ***S. aureus* derivados de infecciones invasivas:** Aislados de *S. aureus* obtenidos de líquidos estériles como LCR y sangre.
- ***S. aureus* multiresistentes:** cepas que presentan resistencia a más de tres familias de antibióticos.
- ***S. aureus* sensibles:** cepas sensibles a todos los antibióticos probados.

1.3 Criterios de inclusión

- Aislados clínicos identificados en el cultivo bacteriológico como *S. aureus* provenientes de pacientes pediátricos con enfermedades infecciosas invasoras Aislados de *S. aureus* multiresistentes.
- Aislados de *S. aureus* sensibles.
- Un solo aislado clínico de *S. aureus* por evento infeccioso de cada paciente.

1.4 Criterios de exclusión

- Cepas de *S. aureus* que presenten resistencia a 1 ó 2 antibióticos.
- Aislado clínico no recuperable

1.5 Obtención de cepas de *S. aureus*

Se hizo una selección de cepas de *S. aureus*, provenientes de líquidos estériles (LCR, sangre), registrados en la base de datos del cepario del laboratorio de Bacteriología Intestinal del HIMFG, obtenidas en el período de enero del 2006 a junio del 2007, estas cepas están conservadas en gelositas [3.7% agar BHI (BD-BBL); 4% agar soya tripticaseína (BD-Difco)] a temperatura ambiente, las cepas seleccionadas fueron resembradas en placas de agar sangre y conservadas a -70°C en viales con 10% de leche descremada Skim Milk (BD-Difco).

1.6 Puebas de identificación de *S. aureus*

Las cepas de *S. aureus* fueron descongeladas sobre placas de agar sangre e incubadas a 37°C por 24 horas, *S. aureus* fue identificado sobre la base de sus características fenotípicas convencionales: Morfología colonial, Tinción de Gram, actividad de catalasa, producción de coagulasa en plasma de conejo, fermentación del manitol, crecimiento en caldo BHI con NaCl al 15%. (MacFadin, 2003; Murray, 2005). Anexo 1.

1.7 Susceptibilidad a antimicrobianos

1.7.1 Método de dilución en agar

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada cepa fue determinada por el método de dilución en agar recomendado por el CLSI, antes NCCLS, para ello se hicieron diluciones seriadas en placas de agar Mueller Hinton (MH) con concentraciones de: 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg/ml de los siguientes antibióticos: oxacilina, eritromicina, claritromicina, clindamicina, linezolid, ciprofloxacino, gentamicina, cefaclor, meropenem, vancomicina y trimetropim/sulfametoxazole, en el caso de oxacilina se le adicionó 2% de NaCl. Se utiliza oxacilina debido a que químicamente es más estable que la metilina y como son antibióticos relacionados muestran espectros de actividad casi idénticos (Mendoza, 2003). Se preparó una suspensión equivalente al 0.5 de McFarland de cada uno de los aislados y se hizo una dilución 1:10, para tener aproximadamente 1×10^7 células/ml, se colocaron en un replicador, depositando sobre las placas con antibióticos aproximadamente de 1 a 2×10^4 bacterias, fueron incubadas a 35°C de 18 a 20 horas, 24 horas para oxacilina, se registraron los valores de susceptibilidad, considerando como CMI la primera concentración que inhibía completamente el desarrollo de las colonias de *S. aureus*.

Como cepa control se utilizó la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213. El criterio interpretativo de susceptibilidad fue de acuerdo a las guías del CLSI. (anexo 2).

1.8 Genotipificación del gen *agr* de *S. aureus*

1.8.1 Extracción de DNA de *S. aureus*

El DNA genómico fue extraído a partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas en gelosa sangre, usando el kit comercial (Wizard), previo tratamiento enzimático. Las bacterias fueron crecidas en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) a 37°C/24horas, los cultivos fueron centrifugados a 8000g por 3 minutos a 4°C. la pastilla fue lavada 3 veces y resuspendida en 100 µl de buffer TE (10 mM Tris HCl + 1 mM EDTA, pH 8.0) con 25 µl de lisozima (2mg/ml), 25 µl de proteinasa K (100 µg/ml), 25 µl de lisostaphyn (1mg/ml) y se incubó a 37°C por 1 hora.

1.8.2 PCR múltiple para identificar grupos *agr* específicos

El ensayo de PCR múltiple se llevó acabo usando oligonucleótidos específicos derivados de la región variable RNAll del locus *agr* . un iniciador en avanzada que corresponde a una secuencia conservada del gen *agrB* fue usado en todas las reacciones y cuatro primers reversos específicos de cada grupo *agr* basados en los polimorfismos nucleotídicos del gen *agrD* y *agrC* (**Figura 5**). Las secuencias de los iniciadores y número de acceso del GenBank, se muestran en la **Tabla 4**. Se hizo una mezcla de reacción de 25 µl con: 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (promega), 200 µM dNTPs (promega), 1.5 mM MgCl₂ (promega), 0.3 µM de cada uno de los oligonucleótidos, 100 ng de DNA y agua libre de nucleasas, cepas control positivas de los grupos I, II y III fueron incluidos: **tipo I. *S. aureus* USA300 (441pb); tipo II. *S. aureus* 1749 (575pb); y tipo III. ATCC 25923 (323pb).**

el programa de temperaturas utilizado se muestra en la **Tabla 5**. Las amplificaciones fueron llevadas acabo en un termociclador (thermo hybaid, modelo PCR Sprint), los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/ml de EtBr en buffer de electroforesis TBE 0.5X a 100 V por 45 minutos (Gilot y col, 2002, Shopsin y col, 2003). La longitud de los fragmentos de PCR fue estimada por comparación con los marcadores de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

BIBLIOTECA UACM

Tabla 4 Secuencia de primers utilizados en el ensayo de PCR múltiple

Iniciador	Secuencia	Tamaño Amplificado	Número de Acceso	Referencia
<i>agr 1</i>	En avanzada 5'- ATG CAC ATG GTG CAC ATG C -3' Reverso 5'- GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT-3'	441 pb	AF210055	Gilot y col, 2002
<i>agr 2</i>	En avanzada 5'- ATG CAC ATG GTG CAC ATG C -3' Reverso 5'- TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC-3'	575 pb	AF001782	Gilot y col, 2002
<i>agr3</i>	En avanzada 5'- ATG CAC ATG GTG CAC ATG C -3' Reverso 5'-GTAATGTAATAGCTTGTA AAAAGTGCCATAGC-3'	323 pb	AF001783	Gilot y col, 2002
<i>agr 4</i>	En avanzada 5'- ATG CAC ATG GTG CAC ATG C -3' Reverso 5'- CGA TAA TGC CGT AAT ACC CG- 3'	659 pb	AF288215	Gilot y col, 2002

Tabla 5. Condiciones utilizadas para la amplificación de los cuatro tipos *agr* (I-IV)

1 ciclo	94°C 5min
26 ciclos	94°C 30 seg
	55°C 30 seg
	72°C 60 seg
1 ciclo	72°C 10 min

1.9 Expresión de delta hemolisinas

La función de la molécula RNAlII fue medida por la producción de la toxina delta hemolisina. La expresión de la delta hemolisina fue determinada usando una cepa de *S. aureus* que produce una gran zona de delta hemólisis incompleta. Las beta y delta hemolisinas de *S. aureus* actúan sinérgicamente en la lisis de eritrocitos de carnero. La cepa de *S. aureus* productora de beta hemólisis incompleta fue estriada verticalmente en una placa de agar sangre de carnero. Las cepas de *S aureus* multirresistentes y sensibles fueron estriadas perpendicularmente sin tocar la estria vertical y se incubó a

37°C durante 24 horas. Una zona de hemólisis completa dentro de la zona de hemólisis incompleta se considero una prueba positiva (Sakoulas y col, 2002).

1.10 Análisis de la expresión de los genes *spa* y *hld* de *S. aureus*

1.10.1 Extracción de RNA total

Cultivos de toda la noche de aislados de *S. aureus*, fueron diluidos DO_{600nm} 0.05 en medio BHI fresco y crecidos por 4 horas en fase exponencial, DO_{600nm} 0.6-0.8 y 11 horas para la fase pos-exponencial, DO_{600nm} 1.2-1.4 a 37 °C sin agitación, centrifugados a 8000g por 3 minutos a 4°C. las pastillas fueron lavadas 3 veces y resuspendidas en 100 µl de buffer TE (10 mM Tris HCl + 1 mM EDTA, pH 8.0) con 25 µl de lisozima (2mg/ml), 25 µl de proteinasa K (100 µg/ml), 25 µl de lisostaphyn (1mg/ml) e incubadas a 37°C por 1 hora. El RNA de las bacterias fue extraído usando trizol (Invitrogen) como sigue : 1ml de trizol se mezcló con cada paquete celular, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionó 0.2 ml de cloroformo se incubó 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000g/15minutos/4°C, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó con 0.5 ml de Isopropanol, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000g/10 minutos/4°C, se lavó la pastilla con etanol al 75%, se centrifugó a 7500g /5minutos /4°C, se secó el RNA a 37°C y se determinó la concentración espectrofotométricamente.

1.10.2 Análisis de la expresión de los genes *spa* y *hld* por RT-PCR

El RNA fue purificado por tratamiento con DNasa por 30 min a 37°C. la primera cadena de ADN fue sintetizada usando la enzima MuLv del sistema de síntesis para RT-PCR de Applied Biosystem, usando 200 ng de ARN purificado en una mezcla de reacción de 20µl que contenia 5mM de $MgCl_2$, buffer de PCR 1X, 1 µM de cada uno de los dNTPs (dGTP, dTTP, dCTP, dATP), 1 u de inhibidor de RNasa, 2.5 U de MuLv y 2.5 µM de Random hexameros, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se sometió al siguiente programa de temperaturas: 15minutos 42°C, 5minutos 99°C y 5minutos 5°C en un termociclador (modelo). Para establecer el número de ciclos en el cual no se ha saturado el producto de amplificación de los genes *hld*, *spa* y *16S*, se amplificó el ADN_C de la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 a diferentes ciclos: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 en una mezcla de de reacción de 25 µl que contenía: 2 mM de $MgCl_2$, buffer de PCR 1X, 0.625 U de Taq polimerasa, 5 µl de ADN_C y 0.3 µM de cada uno de

los primers cuya secuencia aparece en la **Tabla 6**. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador (thermo hybrid, modelo PCR Sprint) y el programa utilizado aparece en la **Tabla 7**. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio en buffer de electroforesis TBE 0.5X a 100 V por 1.20 hrs, visualizados y fotografiados con luz UV en un fotodocumentador Chemi. Doc (Bio-Rad).

Tabla 6. Secuencia de primers utilizados en el ensayo de RT-PCR

Gen	Secuencia de los iniciadores	Tamaño Amplificado	Número de Acceso	Referencia
<i>spa</i>	En avanzada 5'-TATCTGGTGGCGTAACACCTG- 3' Reverso 5'-GATGAAGCCGTTACGTTGTTC-3'	322pb	J01786.	Goerke y col, 2000
<i>hld</i>	En avanzada 5'- GAAGGAGTGTTCATG- 3' Reverso 5'-TAAGAAAATACATAGCACTGAG- 3'	260 pb	X52543	Goerke y col, 2000
16S	En avanzada 5'- TCCGGAATTATTGGGCGTAA- 3' Reverso 5'- CCACTTTCCTCTTCTGCACTCA- 3'	121pb	NC007795	Goerke y col, 2000

Tabla 7. Condiciones utilizadas para las amplificaciones de los genes *spa*, *hld* y 16S por RT-PCR

<i>hld</i>		<i>spa</i>		16S	
1 ciclo	94°C 2 min	1 ciclo	94°C 2 min	1 ciclo	94°C 2 min
25 ciclos	94°C 30 seg	25 ciclos	94°C 30 seg	15 ciclos	94°C 30 seg
	50°C 30 seg		55°C 30 seg		53°C 30 seg
	68°C 45 seg		68°C 45 seg		68°C 45 seg
1 ciclo	68°C 7 min	1 ciclo	68°C 7 min	1 ciclo	68°C 7 min

1.10.3 Análisis densitométrico de RT-PCR de los genes *hld* y *spa*

Las imágenes de los transcritos de los genes *hld* y *spa* de los aislados clínicos de *S. aureus* multirresistentes y sensibles fueron usadas para determinar la densidad de cada banda, utilizando el programa Quantity one.

1.10.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo usando el paquete SPSS 15. La diferencia en la expresión de los genes *hld* y *spa* en las fases de crecimiento exponencial y pos exponencial, en los grupos multirresistentes y sensibles fue analizada por la prueba de Wilcoxon para contrastar muestras pareadas. Esta prueba nos permite analizar muestras pequeñas y no requiere asumir normalidad de la población. El parámetro que usa esta prueba estadística es la mediana.

IX Resultados

1. Susceptibilidad antimicrobiana

En la base de datos del cepario del Laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), se encontraron registradas 49 cepas de *S. aureus* intrahospitalarias de niños con procesos infecciosos invasivos de pacientes pediátricos que utilizaron los servicios de salud de este Hospital de enero del 2006 a junio del 2007. Los cultivos fueron remitidos al laboratorio de Bacteriología Intestinal. Las 49 cepas fueron clasificadas en multirresistentes y sensibles, de acuerdo a el patron de susceptibilidad a 11 antibióticos, por el método de dilución en agar. 20 presentaron resistencia a más de tres familias de antibióticos (multirresistentes); 13 fueron sensibles a todos los antibióticos utilizados (sensibles) y 16 presentaron resistencia a uno ó dos antibióticos. Estas últimas fueron descartadas del estudio. El patron de susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* multirresistentes y sensibles se muestran en las **Tablas 8 y 9**. El grado de resistencia a oxacilina (SAMR) fue de 44.8%. El 90% de estas cepas presentó multirresistencia.

2. Determinación del tipo *agr* en los aislados de *S. aureus* multirresistentes y sensibles.

Para establecer si hay correlación entre el tipo *agr* y la multirresistencia. Se determinó el tipo *agr* de cada uno de los aislados clínicos intrahospitalarios de *S. aureus* multirresistentes y sensibles, derivados de procesos infecciosos invasivos por PCR múltiple. Como lo muestra la **Figura 9**, se obtuvieron amplificados de los tamaños esperados: *agr* I (441pb), *agr* II (575pb), *agr* III (323pb) y *agr* IV (659pb); se encontró que 80% de las cepas multirresistentes presentó *agr* tipo II, 10% tipo III y 10% expresó combinación de los tipos I y II, por el contrario en las cepas sensibles no hubo predominancia de alguno de los tipos: 23% fue tipo I, 23% tipo II, 30.7% tipo III, 7.7% tipo IV y 15.4% presentó combinación de dos tipos (I y II; I y III). **Tabla 10**. Nuestros resultados muestran que hubo predominancia del tipo *agr* II en las cepas multirresistentes.

Tabla 8. Patron de susceptibilidad de las Cepas de *S. aureus* multirresistentes

CEPA	CC	CF	VAN	CLA	CIP	STX	OXA	GM	ERI	MEM	LZN
1R	> 128	> 128	1	> 128	64	0,5	16	1	> 128	64	2
2R	> 128	> 128	1	> 128	64	0,5	16	1	> 128	64	2
3R	> 128	> 128	1	> 128	64	0,5	16	1	> 128	64	2
4R	> 128	> 128	1	> 128	64	0,5	16	0,5	> 128	64	2
5R	> 128	> 128	0,5	> 128	64	0,5	16	0,5	> 128	32	2
6R	> 128	> 128	1	> 128	64	0,5	16	1	> 128	64	2
7R	8	> 128	1	> 128	64	0,5	16	0,5	> 128	64	2
8R	8	> 128	1	> 128	64	0,5	16	1	> 128	64	2
9R	>128	>128	1	>128	64	1	>128	1	>128	32	2
10R	0,12	64	0,5	32	0,25	0,5	64	0,5	128	8	2
11R	0,06	> 128	1	> 128	32	0,5	8	0,5	> 128	0,12	0,5
12R	>128	>128	1	>128	64	1	>128	2	>128	32	2
13R	>128	128	0,5	>128	128	0,5	>128	0,5	<128	16	4
14R	>128	>128	1	>128	128	2	>128	0,5	>128	32	4
15R	>128	>128	1	>128	128	4	>128	1	>128	32	4
16R	0,125	128	1	0,06	0,25	1	32	64	0,25	4	4
17R	>128	>128	1	>128	>128	1	>128	0,5	>128	16	4
18R	>128	>128	1	>128	128	2	>128	1	>128	32	4
19R	>128	>128	1	>128	>128	1	>128	0,5	>128	16	4
20R	>128	>128	1	>128	>128	2	>128	0,5	>128	32	4

Las concentraciones están dadas en μ g/ml

Tabla 9 . Patron de susceptibilidad de las Cepas de *S. aureus* sensibles

CEPA	CC	CF	VAN	CLA	CIP	STX	OXA	GM	ERI	MEM	LZN
1S	0.12	6	0.5	0.125	0.25	1	1	0.5	0.125	0.125	2
2S	0.06	8	0.5	0.25	2	0.5	0.06	0.5	0.12	0.12	2
3S	0.06	4	0.5	0.25	2	0.5	0.12	0.5	0.12	0.12	2
4S	0.06	8	0.5	0.25	2	0.5	0.12	0.5	0.12	0.12	2
5S	0.25	2	0.5	0.06	0.25	1	1	0.5	0.25	0.125	2
6S	0.03	4	0.5	0.25	1	0.5	0.06	0.5	0.12	0.12	2
7S	0.125	4	0.5	0.06	0.5	1	0.5	1	0.25	0.125	4
8S	0.12	0.12	0.5	0.25	1	0.5	0.06	0.5	0.12	0.12	2
9S	0.12	0.5	0.5	0.06	0.25	0.5	0.125	0.5	0.25	0.06	2
10S	0.12	8	0.5	0.06	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.125	2
11S	0.06	4	0.5	0.5	1	0.5	0.06	0.5	0.25	0.12	2
12S	0.125	2	0.5	0.125	0.25	1	1	0.5	0.25	0.125	4
13S	0.125	2	1	0.06	0.25	1	0.5	0.25	0.25	0.125	4

Las concentraciones estan dadas en μ g/ml

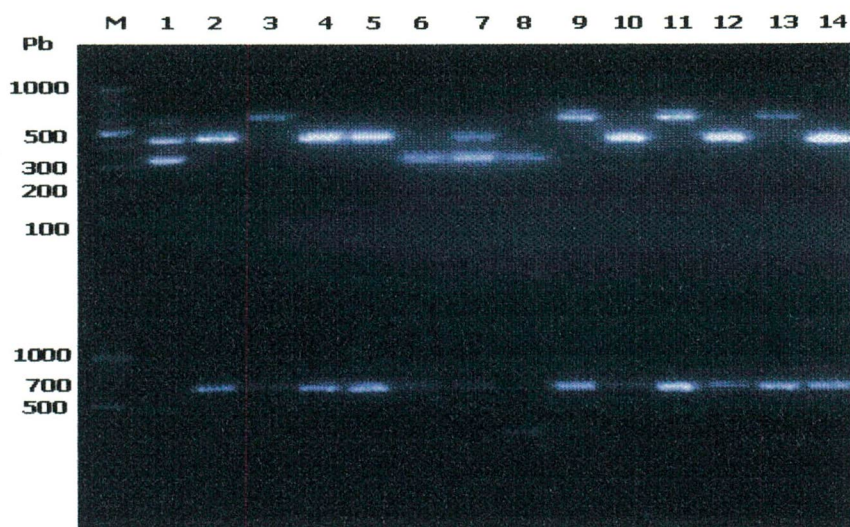


Figura 9. Ensayo de PCR múltiple para la identificación de grupos *agr* específicos. La PCR fue llevada a cabo con DNA genómico de los aislados clínicos de *S. aureus* multiresistentes (panel de arriba) y sensibles (panel de abajo) con un set de primers específicos: (Pan, *agr1*, *agr2*, *agr3* y *agr4*), donde carril M: marcadores de peso molecular carril 1: controles: tipo II. *S. aureus* 1749 (575pb); tipo I. USA300 (441pb) y tipo III. ATCC 25923 (323pb). Carriles 1 a 13: amplificados de las cepas multiresistentes y sensibles.

Tabla 10. Grupo *agr* al que pertenecen los aislados de *S. aureus* multiresistentes y sensibles

<i>S. aureus</i>	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo II, I	Tipo III-I
Resistentes		16/20	2/20		2/20	
Sensibles	3/13	3/13	4/13	1/13	1/13	1/13

3. Expresión fenotípica de la toxina delta hemolisina

Encontramos que 16/20 cepas de *S. aureus* multiresistentes expresaron delta hemolisinas mientras que 4/20 no lo expresó. En el grupo de sensibles 10/13 expresó delta hemolisinas y 3/13 no lo expresó, por lo que se deduce que la mayoría de las cepas tiene su gen *hld* funcional (**Figura 10 y Tabla 11**).

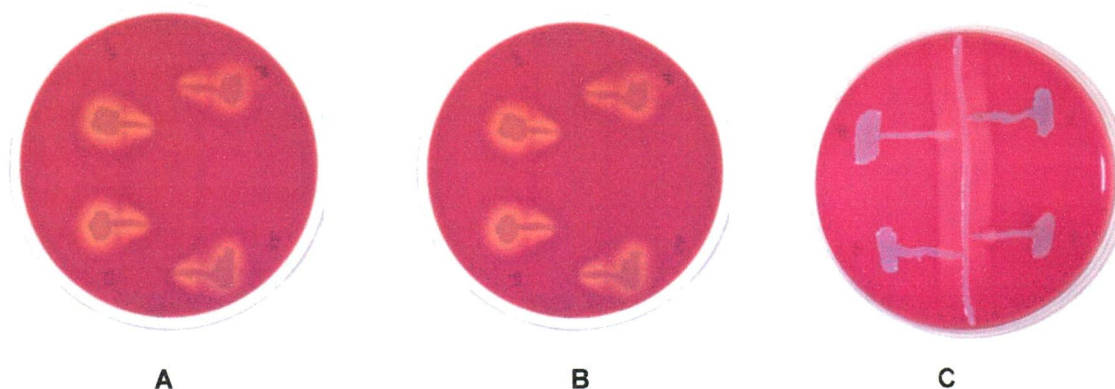


Figura 10. Ensayo de expresión fenotípica de delta hemolisinas. Placas de agar sangre de carnero estriadas verticalmente con una cepa de *S. aureus* que produce una gran zona de β hemólisis incompleta y aislados clínicos de *S. aureus* intrahospitalarios derivados de procesos invasivos estriados horizontalmente: A) *S. aureus* multirresistentes; B) *S. aureus* sensibles ; C) cepas de *S. aureus* que no producen δ hemólisis. La zona de hemólisis completa dentro de la hemólisis incompleta causada por la β lisina de la cepa de *S. aureus* estriada verticalmente fue una prueba positiva.

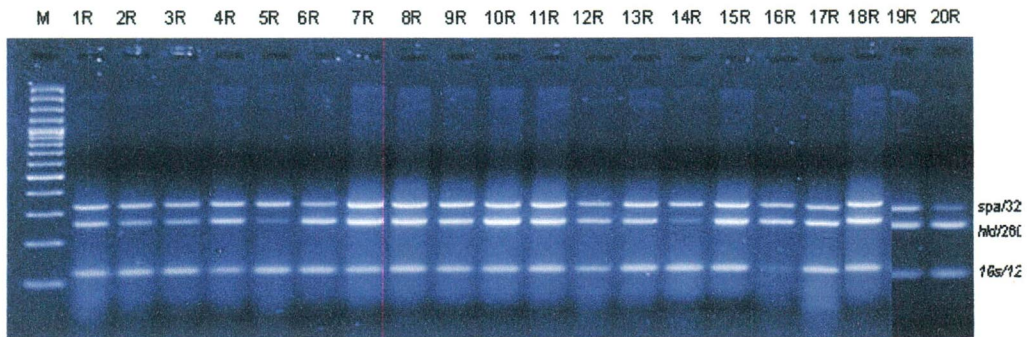
Tabla 11. Expresión fenotípica de delta hemolisinas en aislados de *S. aureus* multirresistentes y sensibles

	Cepas que expresan delta hemolisinas	% expresión
Multirresistentes	16/20	80
Sensibles	10/13	76.9

4 Expresión de los genes *spa* y *hld* de *S. aureus* por RT-PCR.

Para evaluar si la multirresistencia afecta la expresión de la molécula RNA III en aislados clínicos intrahospitalarios de *S. aureus* procedentes de infecciones invasivas, se obtuvo el RNA de los aislados de *S. aureus* multirresistentes y sensibles en las fases de crecimiento exponencial y pos exponencial, posteriormente se llevó a cabo el ensayo de RT-PCR con los iniciadores de dos genes regulados por RNA III: *hld* y *spa*. *hld* es regulado positivamente a nivel transcripcional por RNA III en la fase de crecimiento pos exponencial mientras que la transcripción de *spa* es reprimida. Los resultados de la retro-transcripción en punto final se muestran en la **Figura 11** para las cepas multirresistentes y en la **Figura 12** las cepas sensibles, donde se observa que disminuye la expresión de los genes *hld* y *spa* de la fase exponencial a la fase pos exponencial tanto en las cepas multirresistentes como en las cepas sensibles.

Fase exponencial



Fase Pos- Exponencial

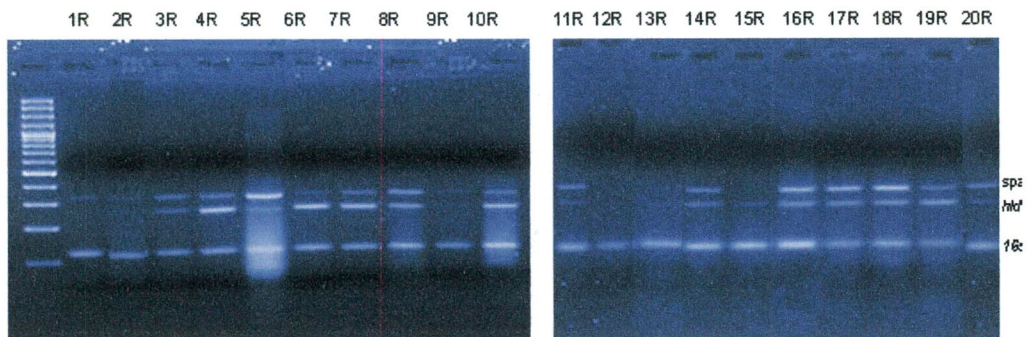


Figura 11. Expresión por RT-PCR de los genes *hld* y *spa* de aislados clínicos de *S. aureus* multirresistentes en las fases de crecimiento exponencial y pos exponencial. El RNA de cada cepa fue extraído en la fase de crecimiento exponencial y pos-exponencial, cantidades iguales de RNA se utilizaron para llevar a cabo el ensayo. iniciadores específicos de los genes de virulencia *hld* y *spa* fueron usados.

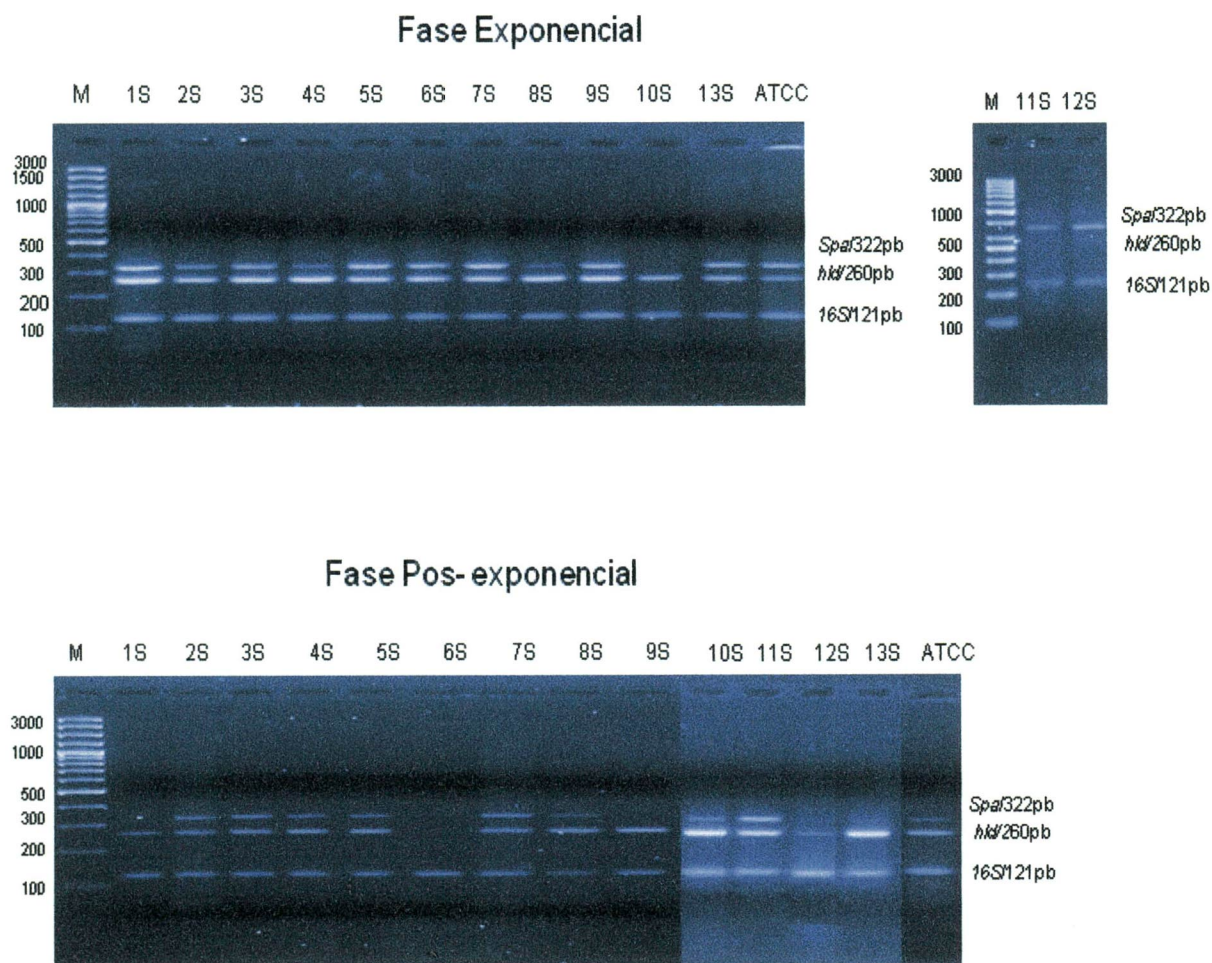


Figura 12. Expresión por RT-PCR de los genes *hld* y *spa* de aislados clínicos de *S. aureus* sensibles en las fases de crecimiento exponencial y pos exponencial. El RNA de cada cepa fue extraído en la fase de crecimiento exponencial y pos-exponencial, cantidades iguales de RNA se utilizaron para llevar a cabo el ensayo. Iniciadores específicos de los genes de virulencia *hld* y *spa* fueron usados.

3. Análisis densitométrico

Se hizo análisis densitométrico de los productos de RT-PCR de los genes *hld* y *spa*. Las **Figuras 13 y 14** muestran la distribución de los datos obtenidos en gráficas donde se encierra el 50% de los valores centrales dentro de una caja. Dentro de la caja se dibuja una línea en la que se sitúa la mediana o valor central de la distribución. De esta caja salen unos bigotes cuya longitud está relacionada con los valores superior e inferior de la distribución. También se muestran los cuartiles, y los valores extremos. En la gráfica de la expresión del gen *hld* en el grupo de cepas sensibles se observan 3 valores extremos en la fase exponencial y 2 en la fase pos-exponencial, marcados con asteriscos. Se observa una distribución heterogénea de los datos.

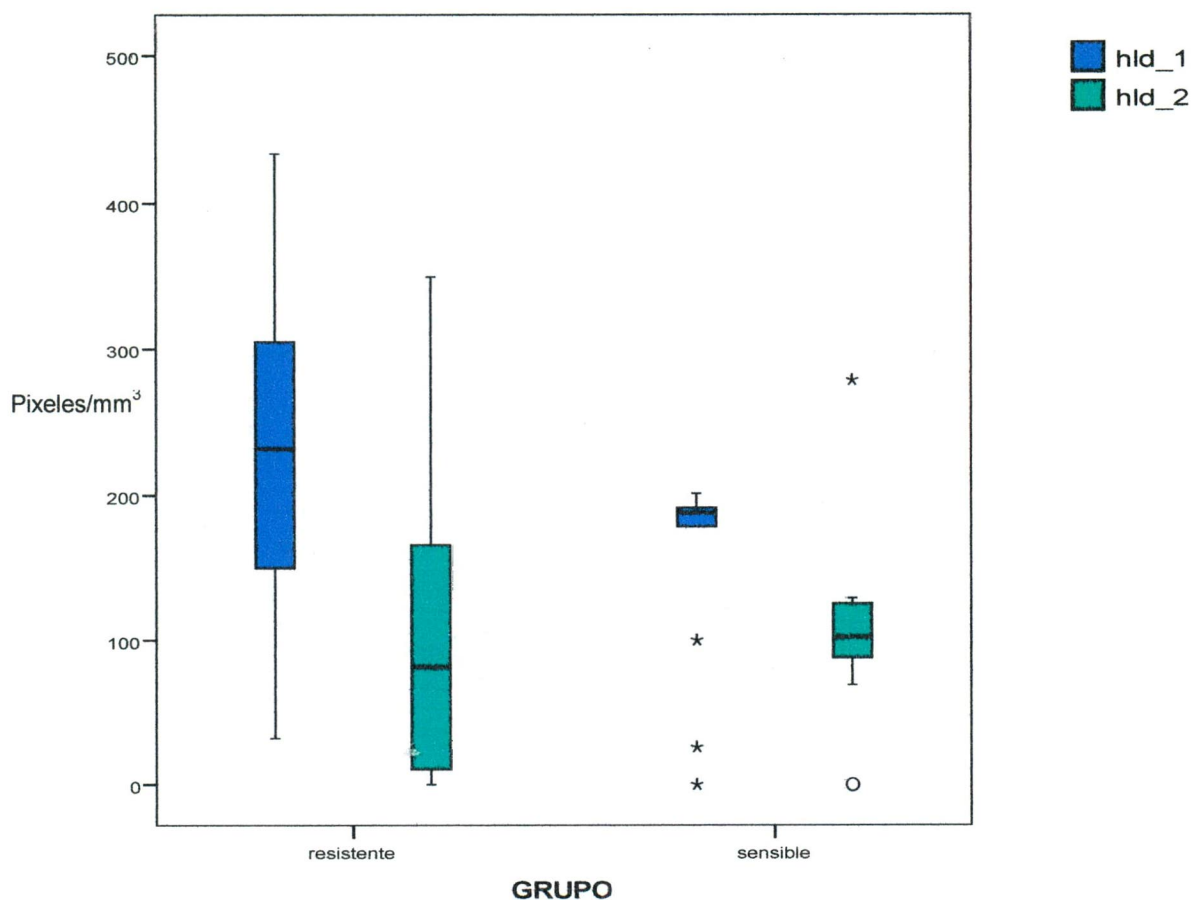


Figura 13. Análisis densitométrico de la expresión del gen *hld* por RT-PCR. En aislados clínicos de *S. aureus* multirresistentes y sensibles y provenientes de niños con procesos invasores, durante crecimiento *in vitro*, en las fases exponencial (*hld_1*) y pos-exponencial (*hld_2*).

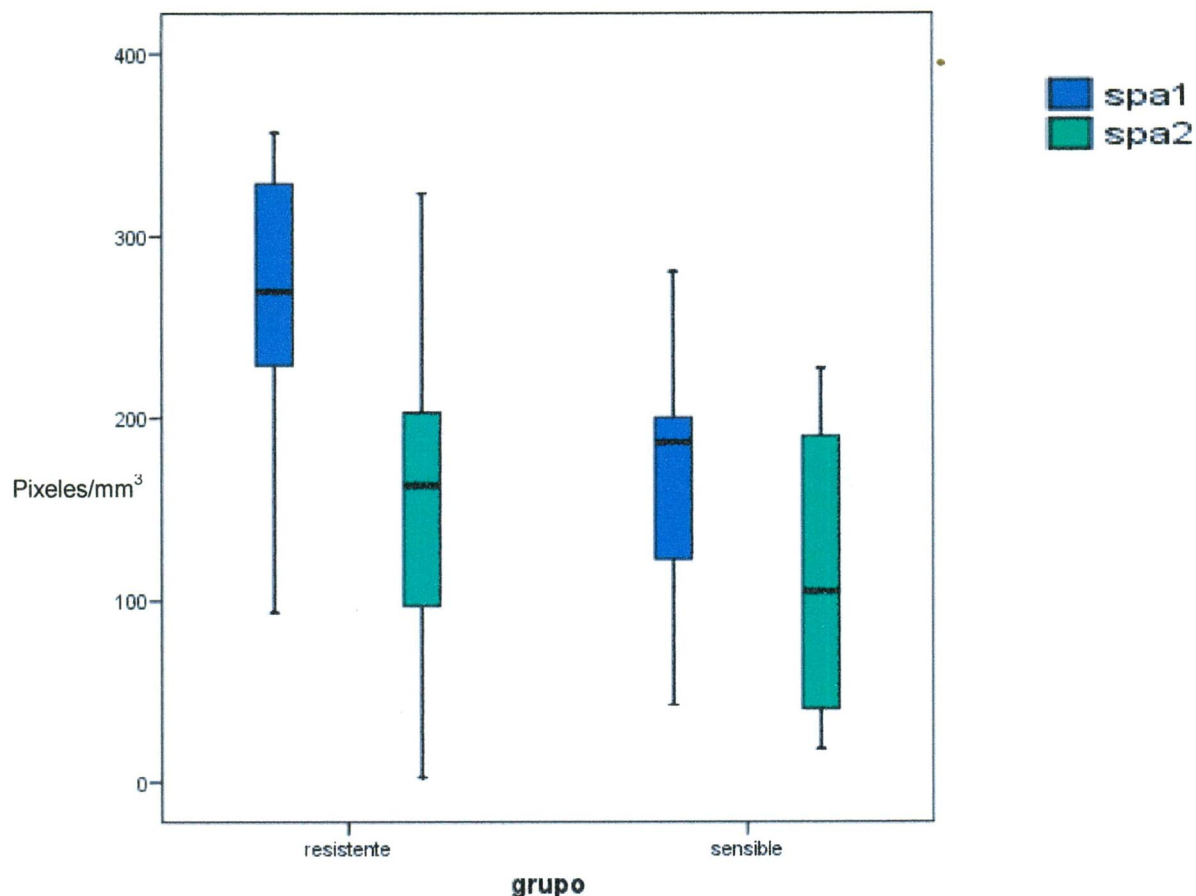


Figura 14. Análisis densitométrico de la expresión del gen *spa* por RT-PCR. En aislados clínicos de *S. aureus* multirresistentes y sensibles provenientes de niños con procesos invasores, durante crecimiento *in vitro*, en las fases exponencial (*spa1*) y pos- exponencial (*spa2*).

6. Análisis estadístico

Para detectar diferencias en el nivel de expresión de los genes *hld* y *spa* entre los grupos multirresistente y sensibles se utilizó la **Prueba de Wilcoxon** para contrastar datos pareados. El análisis muestra que hubo disminución estadísticamente significativa en el nivel de expresión de los genes *hld* y *spa* de la fase exponencial a la fase pos-exponencial en el grupo de cepas multirresistentes, mientras que en el grupo de cepas sensibles la disminución no fue significativa **Tabla 12**. En condiciones ideales la molécula RNA III induce aumento en el nivel de transcripción del gen *hld* en la fase de crecimiento pos-exponencial, la disminución observada en nuestros resultados sugiere que la transcripción de la molécula RNAIII se ve afectada en cepas con resistencia múltiple.

Tabla 12. Prueba de Wilcoxon para contrastar datos pareados.

		Spa1-spa2	<i>hld1-hld2</i>
Resistentes	significancia	0.004	0.004
Sensibles	significancia	0.136	0.086

X Discusión

Este estudio muestra que el 40% de las cepas intrahospitalarias derivadas de procesos invasivos del HIMFG son multirresistentes y 26.5% sensibles, mientras que el 44% fue SAMR, este dato cae dentro de los valores reportados en otros países para cepas SAMR intrahospitalarias, como lo evidencian los estudios de vigilancia epidemiológica registrados: en Korea; 64% (Bin Kim y col, 2004); en Japon 70% (Bustos-Martínez y col, 2006); en Norte América; 38-50% (Kuehnert y col, 2005); en la India; 18-43% (Bodonaik y col, 1984); en las islas canarias; 25% (Montesinos y col, 2003). Algunos países de Sudamérica y Europa muestran prevalencias mayores al 50%. Asimismo, reportes en Jamaica, Cuba y Francia muestran índices menores del 10%. Las diferencias observadas entre países, se atribuyen a variaciones en la población de los pacientes, a las características biológicas de las cepas o bien a las medidas tomadas para controlar las infecciones (Orrett y col, 2006).

El 90% de las cepas SAMR presentó multirresistencia, la asociación de cepas SAMR nosocomiales con multirresistencia ya ha sido reportada (Chini y col, 2006; Verdier y col, 2004).

En este trabajo investigamos si el tipo *agr* se correlaciona con la multirresistencia en los aislados clínicos de *S. aureus* multirresistentes y sensibles derivados de infecciones invasivas, encontramos que las cepas multirresistentes presentan predominantemente el tipo II, mientras que las sensibles tuvieron una distribución balanceada de los tipos I, II y III, y solo una cepa presentó el tipo IV.

Diversos estudios han demostrado que grupos específicos *agr* están asociados con diferentes situaciones clínicas. Por ejemplo MRSA adquirido en la comunidad usualmente tiene el polimorfismo *agr* III, mientras que MRSA adquirido en el hospital pertenecen al tipo *agr* II. Aislados clínicos de *S. aureus* con resistencia Intermedia a vancomicina (VISA) también están altamente enriquecidos en el grupo *agr* II y las cepas productoras de exfoliatinas predominantemente son del tipo *agr* IV. Se ha reportado que las cepas VISA y hetero VISA de Japón y Estados Unidos expresan resistencia a meticilina (SAMR) pertenecen al grupo *agr* II, mientras que en países Europeos predomina el grupo *agr* I (Sakoulas y col, 2005; Verdier y col, 2004; Moise-Broder y col, 2004). De lo que se deriva que las cepas SAMR están estrechamente asociadas con multirresistencia y con el fenotipo VISA. Nosotros no encontramos ninguna cepa VISA o hetero-VISA, situación que pone en ventaja a los pacientes.

Algunos tipos clonales con defectos en el gen regulador global *agr* tipo II le confiere ventajas bajo presión selectiva de vancomicina; el análisis de la secuencia del gen *agr*, de una cepa SAMR tipo *agr* II de un paciente antes del tratamiento con vancomicina y después de 50 días de tratamiento, mostró que el aislamiento tomado después de 50 días de tratamiento había adquirido el fenotipo hetero-VISA y presentaba mutaciones en la región *agrA* del locus *agr* (Sakoulas y col, 2002).

En un estudio utilizando dos cepas de laboratorio, una *agr* tipo II y la otra mutada en el gen *agr* II, fueron expuestas a concentraciones incrementadas de vancomicina *in vitro*, por pases seriados, ambas exhibieron un aumento en la concentración mínima inhibitoria, únicamente la cepa nula en *agr* II adquirió el fenotipo VISA, esta disminución en la susceptibilidad a vancomicina se atribuyó a la pérdida del gen *agr* (Sakoulas y col, 2005), lo que sugiere que cepas con mutaciones en *agr* probablemente sean fácilmente seleccionadas durante la terapia con vancomicina en las infecciones estafilocócicas (Sakoulas y col, 2005).

Con respecto a los resultados en las cepas sensibles, estos concuerdan con los hallados por Jarraud y col, 2002. Ellos determinaron el tipo *agr* en aislados clínicos de *S. aureus* meticilino susceptibles adquiridos en la comunidad (SAMS-CA), en los cuales encontraron una distribución uniforme de los cuatro tipos *agr*, aunque en el estudio no mencionaron el patrón de susceptibilidad a otros antibióticos, generalmente las cepas SAMS son sensibles a la mayoría de los antibióticos. En el mismo estudio analizaron la relación del tipo *agr* con las infecciones producidas por *S. aureus*, encontraron una fuerte asociación entre el tipo *agr* y la enfermedad, particularmente las enfermedades mediadas por toxinas, como el tipo IV que estuvo involucrada en síndromes exfoliativos generalizados e impétigo buloso, el tipo III con enfermedades mediadas por la TSST-1, el tipo I y II con enfermedades mediadas por enterotoxinas y endocarditis (Jarraud y col, 2002). Nosotros estudiamos exclusivamente cepas intrahospitalarias y el tipo *agr* IV se asocia principalmente con enfermedades de la piel y adquiridas en la comunidad (síndrome de piel escaldada), por lo que la cepa tipo IV que nosotros encontramos pudo haberse transmitido de la piel a la sangre o bien el paciente se infectó de un portador de la comunidad (visita de algún familiar o personal del hospital).

Resultados similares fueron observados en otro trabajo donde analizaron la distribución de los cuatro grupos *agr* en 38 aislados de SAMS de origen nosocomial, 23

pertenecieron al grupo I, 10 al grupo II, 5 al grupo III y ninguno al grupo IV (Moore y col, 2001). También Shopsin y col, 2003, obtuvo una distribución balanceada de los tipos I, II y III cuando estudió una población de aislados de *S. aureus* SAMS de niños y sus guardianes, tampoco mencionó el patrón de susceptibilidad de las cepas estudiadas (Shopsin y col, 2003).

Asimismo, se identificaron dos cepas multirresistentes y dos cepas sensibles que presentaron los tipos *agr* (I y II) y (I y III) lo que se atribuye a la presencia de segmentos de secuencias de ambos tipos, como lo demostró Francois y col, 2006. En dicho estudio evaluaron una técnica nueva para la tipificación del grupo *agr*, ellos encontraron dos cepas que mostraban el tipo I y IV, al realizar la secuenciación de la región hipervariable del locus *agr* en estas cepas, encontraron que las dos tenían segmentos de ambas secuencias I y IV (Francois y col, 2006). En otro reporte clasificaron en diferentes tipos de restricción los cuatro grupos *agr*, de cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis, notaron que el extremo 3' de la región variable del locus *agr* (mas o menos las dos terceras partes de la molécula) de dos cepas tenían los sitios característicos de restricción del grupo *agr* I, mientras que el extremo 5' de esta región (mas o menos una tercera parte de la molécula) contenía sitios de restricción característicos de los grupos *agr* II y III. Esto fue confirmado por secuenciación lo que sugiere que los genes del locus *agr* están sometidos a presión evolutiva y la presencia de dos tipos puede significar que están en proceso de evolución del grupo *agr* I a los grupos *agr* II y III, dichas combinaciones coinciden con las de nuestro trabajo (Sakoulas y col, 2002).

La delta hemolisina es única entre los factores de virulencia regulados por RNA III la molécula efectora del sistema *agr*, porque esta codificada dentro del locus *agr* y se deriva de la traducción de RNA III. La presencia de delta hemolisina en la gran mayoría de cepas de *S. aureus* multirresistentes y sensibles, confirmó la funcionalidad del gen *hld* en ambos grupos. Los hallazgos de ausencia de expresión de delta hemolisinas en 3 aislados sensibles y 4 multirresistentes, sugiere que la función de RNA III pudiera estar suprimida en estos aislados por probables mutaciones en otros genes requeridos para la función de RNA III o una mutación puntual en el gen *hld*, con la consecuente producción de una proteína afuncional. Sin embargo cuando se analizó la expresión del gen *hld* por RT-PCR se observó que dos cepas multirresistentes tenían una expresión muy baja del gen, y por lo tanto si la expresión de la delta hemolisina fue también baja, el sistema no tuvo la suficiente sensibilidad para detectarlo.

Los resultados de RT-PCR muestran que la transcripción de los genes *hld* y *spa* en el grupo de cepas multirresistentes, disminuyó significativamente de la fase de crecimiento exponencial a la fase pos- exponencial, mientras que en el grupo de cepas sensibles la disminución no fue estadísticamente significativa. RNA III regula positivamente la expresión del gen *hld* de *S. aureus* durante la transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase pos-exponencial. La disminución de la expresión del gen *hld* que nosotros observamos en las cepas multirresistentes sugiere que la transcripción de RNA III se modifica en estas cepas. RNA III reprime la transcripción de genes que codifican para proteínas asociadas a la superficie celular como la proteína A, en la fase de crecimiento pos-exponencial; cepas de *S. aureus* mutadas en el locus *agr*, donde RNA III esta ausente muestran aumento en la expresión del gen *spa* que codifica para la proteína A. Nosotros encontramos disminución de la expresión del gen *spa* en la fase de crecimiento pos-exponencial, lo que se atribuye a la presencia de otros reguladores como *sarA*, el cual también influencia la expresión del gen *spa*, como ya lo han propuesto otros. (Cheung y col, 987; Harris y col, 2002). En un estudio con muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística infectados con *S. aureus*, se detectaron cantidades mínimas del gen *spa*, a pesar del bajo nivel de expresión de la molécula RNAIII, por lo que los autores sugieren que la inhibición simultánea de RNAIII y *spa* indica la presencia de reguladores adicionales no relacionados con *agr* (Goerke y col, 2001). estos resultados indican que la vancomicina no es el único antibiótico que puede modificar la expresión del locus *agr*. Probablemente las cepas multirresistentes al disminuir la producción de factores de virulencia sean menos virulentas.

XI Bibliografía

- Abdelnour** A, Arvidson S, Bremell T, Ryden C, Tarkowski A (1993). The Accessory Gene Regulator (*agr*) Controls *Staphylococcus aureus* Virulence in a Murine Arthritis Model. *infect. immun* 61(9): 3879-3885
- Aucken** HM, Warner M, Ganner M, Jhonson AP, Richardson JF, Cookson BD, Livermore DM (2000). Twenty Months of Screening for Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 639-640.
- Appelbaum** PC (2006). The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 12(suppl. 1): 16-23.
- Archer** GL, Scout J (1991). Conjugate transfer genes in Staphylococcal isolates from the United States. *Agents and Chemother.* 35:2500-2504.
- Ariza** J, Pujol M, Cabo J, Peña C, Fernández N, Linares J, Ayats J, Gudiol F (1999). Vancomycin in surgical infectious due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet.* 353: 1587-1588.
- Baddour** M M, Abuelkheir M M, Fatani AJ (2006). Trends in antibiotic susceptibility patterns and epidemiology of MRSA isolates from several hospitals in Riyadh, Saudi Arabia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 5(30):1-11.
- Balfour** JA, Figgitt DP (2001). Telitromycin drugs. 61: 815-829.
- Barber** M (1947). Staphylococcal Infection due to penicillin-resistance strains. *Br Med J.* 2:863-865.
- Belcheva** A, Golemi-Kotra D (2008). A close-up view of the *VraSR* two-component system. A mediator of *Staphylococcus aureus* response to cell wall damage. *J Biol Chem.* 283(18):12354-64.
- Bin Kim** H, Hee-Chang J, Jung Nam H, Seon Lee Y, Su Kim B, Beom Park W, Deok , Lee K (2004). In vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary care hospitals in Korea: a nationwide study. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1124-1127.
- Bischoff** M, Entenza JM, Giachino P (2001). Influence of a Functional *sigB* Operon on the Global Regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* 183(17): 5171–5179.

Bodonaik NC, King SD, Narla VR (1984). Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* at the university hospital the West Indies. *West Indian Med J*:8-13.

Bustos-Martínez J.A, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*. 17:287-305.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1997). Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin-United States. *MMWR morb Mortal Wkly Rep*. 46:765-766.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin- United States. *MMWR morb Mortal Wkly Rep*. 51: 565-567.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2004). Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: New York. *MMWR morb Mortal Wkly Rep*. 53: 322-323.

Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE Jr, Musher DM, Triplett P, Mylotte JM. A (2003) prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine*. 82: 322-332.

Cheung LC, Bayer A, Peters J, Ward JI (1987). Analysis by gel Electrophoresis, Western Blot, and Peptide Mapping of Protein A Heterogeneity in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun*. 55(4): 843-847.

Cheung, A L, Eberhardt KJ , Cheung E, Yeaman MR, Sullam PM, Ramos M, Bayer. A. S (1994). Diminished virulence of a *sar-/agr-* mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J. Clin. Investig*. 94:1815–1822.

Cheung AL, Eberhardt KJ, Heinrichs JH (1997). Regulation of protein A Syntesis by the *sar* and *agr* loci of *Staphylococcus aureus* *Infect. Immun*. 65(6):2243-2249.

Chini V, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I (2006). Ocurrence of the Enterotoxin Gene Cluster and the Toxic Shock Síndrome Toxin 1 Gene among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Is Related to Clonal Type and *agr* Group. *J.Clin.Microbiol*. 44(5):1881-1883.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Fifteenth Informational Supplement. 25(1).

Coello R, Jiménez J, García M, Arroyo P, Minues D, Fernández C (1994). Prospective study of infection, colonization and carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a outbreak affecting 990 patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 13:74-81.

Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW (2003). Comparison of mortality associated with methicillin resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia : a meta analysis. *Clin.Infect.Dis*. 36:53-59.

Crawford S.E, Daum R.S (2005). Epidemic Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect. Dis J*. 24:459-460.

Cui, L , Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG, Kim M, Ploy Marie-Cecile, El Solh N, Ferraz V, Hiramatsu K (2003). Cell Wall Thickening is a Common Feature of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J.Clin. Microbiol*. 41(1): 5–14

Daum RS, Seal JB (2001). Evolving antimicrobial chemotherapy for *Staphylococcus aureus* infections: Our backs to the wall. *Crit. Care. Med*. 29(4): 92-96.

Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, Boyle-Vavra S (2002). A novel methicillin resistant cassette in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis*. 186: 1344-1347.

De Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A (1997). Wide Geographic Distribution of a Unique Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Clone in Hungarian Hospitals. *Clin. Microbiol. Infect*. 3: 289-296.

DeDent AC, McAdow M, Schneewind O (2007). Distribution of Protein A on the Surface of *Staphylococcus aureus*. *J. Bact*. 189(12): 4473–4484

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert P (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Reviews*. 13(1): 6-34.

Diep BA, Gill SR, Chang RF (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 367(9512): 731-739.

Dufour P, Guillet Y, Bes M (2002). Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton Valentine Leukocidin. *Clin.Infect.Dis*. 35: 819-824.

Fergie JE, Purcell K (2001). Community- acquired methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infectious in South Texas children. *Pediatr Infect Dis J*. 20: 860-863.

Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME et al (2003). Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemoter.* 47: 196-203.

Fleming A (1929). On the Antimicrobial Action of Cultures of a Penicillin, with Special Reference to their Use in the Aislation of *H. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10: 226.

Fluit, AD.C., M.R. Visser, and F-J. Schmitz (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 14: 836-871.

Francois P, Koessler T, Huyghe A, Harbarth S, Bento M, Lew D, Etienne J, Pittet D, Schrenzel J (2006). Rapid *Staphylococcus aureus agr* Type Determination by a Novel Multiplex Real-Time Quantitative PCR Assay. *J.clin.Microbiol.* 44(5):1892-1895.

Frank AL, Marcinak JF, Namgat PD, Schreckenberger PC (1999). Increase in Community- Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in children. *Clin Infect Dis.* 29: 935-936.

Fuchs LY, Chihu L, Conde C, González VM, Noguez AH, Calderón E, Avonce N, Ovando C (1994). Mecanismos Moleculares de la Resistencia Bacteriana. *Salud Pública Méx Vol.* 36(4): 428-438.

Fruit AC, Wielders CLC, Verhoef J, Schmitz FL (2001). Epidemiology and susceptibility of 3051 *Staphylococcus aureus* isolated from 25 university hospitals participating in the European SENTRY Study. *J Clin Microbiol* 39: 3727-2732.

Geisel R, Schmitz FJ, Thomas L, Berns G, Zetsche O, Ulrich B, Fluit AC, Labischinsky H, Witte W (1999). Emergence of Heterogeneous Intermediate Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates in the Dusseldorf Area. *J. Antimicrob Chemother.* 43: 846-848.

Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin E F, DeBoy RT, Fraser1 CM (2005). Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J.Bact.* 187(7): 2426–2438.

Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B (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. *J. Clinic. Microbiol.* 40(11): 4060-4067.

Goerke C, Campana S, Bayer MG, Döring G, Botzenhart, Wolz C (2000). Direct Quantitative Transcript Analysis of the *agr* Regulon of *Staphylococcus aureus* during

Human Infection in Comparison to the expression Profile In Vitro. *Infect. Immun.* 68(3): 1304-1311.

Harris LG, Foster SJ, Richards RG (2002). An Introduction to *Staphylococcus aureus*, and Techniques for Identifying and Quantifying *S. aureus* Adhesins in Relation to Adhesion to Biomaterials: Review. *European Cells and Materials.* 4: 39-60.

Hartman BJ, Tomasz A (1984). Low Affinity Penicillin-Binding Protein Associated with Beta-Lactam Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 158: 513-516.

Hayes MV, Curtis N, Wyke AW, Ward JB (1981). Decreased Affinity of a Penicillin Binding Protein for β -Lactam Antibiotics in a Clinical Isolate of *Staphylococcus aureus* Resistant to Methicillin. *FEMS Microbiol.* 10: 119-122.

Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H (2002). Molecular genetics of methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 292: 67-74

Hiramatsu H, Hanaki T, Ino K, Yabuta T, Oguri F, Tenover L (1997). Several methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains with similar levels of vancomycin resistance have been isolated in other countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 135-136.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Genome Project *S. aureus*.

Hubert SK, Mohamed JM, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE, Tenover FC (1999). Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus*: Evaluation of a Novel Screening method and Results of a Survey of Selected U.S. Hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 37:3590-3593.

Janzon L, Arvidson S (1990). The role of the 6-lysin gene (*hld*) in the regulation of Genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *The EMBO Journal* 9(5): 1 391 – 1399.

Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 70: 631-641.

Ji G, Beavis R, Novick RP (1997). Bacterial Interference caused by autoinducing peptide variants . *Science.* 276:2027-2030.

Kim MN, Hwang SH, Phyo YJ, Mon HM, Pai CH (2002). Clonal Spread of *Staphylococcus aureus* Heterogeneously Resistant to Vancomycin in a University Hospital in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1376-1380

Kirby WMM (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99: 452-453.

- Kirst** HA, Thompson DG, Nicas TL (1998). Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemoter.* 42: 1303-1304.
- Koszczol** C, Katussevani B, Kronke M, Krut O (2006). Subinibitory Quinupristin/dalfopristin attenuate virulence of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemot.* 58: 564-574.
- Krishna** TH, Ranjan SM (2006). Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infectious Diseases.* 6(156): 1-6
- Kuehnert** MJ, Hill HA, Kupronis BA, Tokars JI, Solomon SL, Jernigan. BD (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalization, United States. *Emerg Infect Dis* 11: 868-872.
- Leclercq** R, Courvalin P (1991). Bacterial Resistance to Macrolide Lincosamide and Streptogramin Antibiotics by Target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1267-1272.
- Leclercq** R (1997). Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin. Infect. Dis.* 34: 482-492
- Lindsay** JA, Holden MT (2004). *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome *Trends Microbiol.* 12(8): 378-385.
- Liñares** J (2001). The VISA/GISA problem. Therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect.* 7(supl. 4): 8-15.
- Lowy** FD (2006). Infecciones estafilocócicas En: Harrison, Kasper D, Braunwald E, Fanci A, Hanser S, Longo D, Jameson J. (Eds). *Principios de Medicina Interna*(16ª edición). México. Mc Graw- Hill Interamericana 911-921.
- Lowy** FD (1998). *Staphylococcus aureus* infectious. *N. Engl. J. Med.* 339: 520-532.
- MacFaddin** JF. 2003 . *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica.* Editorial Medica Panamericana SA. Tercera edición. Argentina 73,92.
- Mamani** E, Luján D, Pajuelo G (2006). Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. *An Fac Med Lima* 67(2): 120-124.
- Maranan** MC, Moreira B, Boyle-vavra S, Daum R.S (1997). Antimicrobial Resistance in Staphylococci: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Clinical Relevance. *Infectious Disease Clinics of North America*, 11(4): 813-849.

- Orrett** F A, Land M (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence: Current susceptibility patterns in Trinidad. *BMC Infectious Diseases*. 6(83): 1-6.
- Paniagua** Contrera G L , Monroy Pérez E, Vaca Pacheco S, González Almazán S E (2003). Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. *Revista Médica del Hospital General de México*. 66(1): 13 - 21
- Pattee** PA, Lee CH, Bannantine JP (1990). Genetical and physical mapping of the chromosome of *Staphylococcus aureus*: 41-48.
- Paulse** IT, Firth N, Skurray RA (1997). Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams. En: Crossley KB, Archer GL, eds. *The Staphylococi in human disease*: 158-174.
- Peng** HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P (1998). Cloning, Characterization, and Sequencing of an Accessory Gene Regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Journal. Bact.* 170 (9): 4365-4372.
- Pigrau** C (2003). Oxalidinonas y Glucopéptidos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:157-164.
- Prats**, G (2006). *Microbiología clínica*. Ed. Médica Panamericana. Madrid. pp 35-36, 56-59, 194-200.
- Prescott**, L.M. (2004). *Microbiología*. 5ª edición. Editorial Mc Graw-Hill-Interamericana.
- Pujol** M, Peña C, Pallarés R, Ayats J, Ariza J, Gudiol F (1994). Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 13:96-102.
- Pujol** M, Peña C, Pallarés R (1996). Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carries of methicillin resistant and methicillin susceptible strains. *Am J Med*. 100(5):509-516.
- Reading** NC, Sperandio V (2006). Quorumsensing: the many languages of bacteria. *Minireview FEMS Microbiol Lett*. 254: 1–11.
- Reipert** A, Ehlert K, Kast T, Bierbaum G (2003). Morphological and Genetic Differences in Two Isogenic *Staphylococcus aureus* Strains with Decreased Susceptibilities to Vancomycin. *Antim Agents Chemot.* 47(2): 568–576.
- Reynolds** E, Ross JI, Cove JH (2003). Msr(A) and related macrolide / streptogramin resistance determinants: incomplete transporters. *Antimicrob. Agents*. 22: 228-236.
- Rodríguez** CA, Vesga O (2005). *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. *Biom*, 25: 575-587.

Rojas NM, Fernández N, Espino MH, Fernández MA (2001). Patrones de drogorresistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico humano. Rev cubana med trop. 53(1): 53-8.

Romero- Vivas J, Rubio M, Fernández C, Picazo JJ (1995). Mortality associated with nosocomial bacteremia due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 21(6): 1417-1423.

Rudrick JT (2005). Michigan department of Community Health.http://www.michigan.gov/documents/VRSA_feb_05_HAN_118391_7.pdf.

Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG, Moellering RC, Novick RP, Lucindo N, Yeaman MR, Bayer AS (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.Chemot. 49(7): 2687-2692.

Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG, Moellering RC, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, Gold HS (2002). Accessory Gene Regulator (*agr*) Locus in Geographically Diverse *Staphylococcus aureus* Isolates with Reduced Susceptibility to Vancomycin. Antimicrob.Agents.Chemot. 46(5):1492-1502.

Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC (2003). *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance. J.Infect.Dis. 187: 929-938.

Sánchez SL, Sáenz AE, Pancorbo Mj, Lanchipa YP, Zegarra CR (2004). Antibióticos Sistémicos en dermatología Primera parte: beta lactámicos – Carbapenems– Aminoglucósidos – Macrólidos. Dermatología Peruana. 14(1): 7-20.

Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP (1994). Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 19:1123-1128.

Schaeffler S (1989). Methicillin-resistant. Strains of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones. J. Clin. Microbiol. 27: 335-336.

Schittu AO, Udo EE, L J (2007). Insights on virulence and antibiotic resistance: a review of the accessory genome of *Staphylococcus aureus*. Wounds. 19(9): 237-244.

Shanson DC (1981). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. 2:11-36.

Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J, Kreiswirth BN (2003). Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus*

aureus Strains Colonizing Children and Their Guardians. J Clin Microbiol. 41(1): 456–459.

Shore A, Rossney A.S, Keane C.T, Enright M.C, Coleman D.C (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.

Sieradzki K, Tomasz A (2003). Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *S. aureus*. J Bacteriol. 185: 7103-7110.

Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A (1999). The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection . N Eng J Med. 340:517-523.

Smith TL (1999). Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glicopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. N Engl J Med. 340: 493-501.

Stewart GT, Holt RJ (1963). Evolution of natural resistance to the newer penicillin. BMJ. 1:308-311.

Tenover H (2004). characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* from Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemoter. 48:275-280.

Ubukata K, Yamahita N, Konno M (1985). Occurrence of a β -Lactam Inducible Penicillin Binding Protein in a Methicillin Resistant Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 170-172.

Velázquez-Meza ME, Aires de Souza M, Echaniz-Aviles G, Solórzano-Santos F, Miranda-Navales G, Silva-Sánchez J, De Lencastre H (2004). Surveillance of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Pediatric Hospital in México City during a 7 year period(1997 to 2003): Clonal Evolution and impact of Infection Control. J.Clin.Microbiol. 42(8): 3877-3880.

Velázquez-Meza ME (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilicilinoresistente. Salud Publica Mex . 47: 381-387.

Verdier I, Reverdy ME, Etienne J, Lina G, Bes M, Vandenesch F (2004). *Staphylococcus aureus* Isolates with Reduced Susceptibility to Glycopeptides Belong to Accessory Gene Regulator Group I or II. Antimicrob. Agents. Chemotherap. 48(3): 1024-1027.

- Volper** EM, Greenberg EP, Yarwood JM, Bartels DJ (2004). Quórum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology*. 186(6):1838-1850.
- Walsh** TR, Howe RA (2002). The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:657-675.
- Wenzel** RP, Reagan DR, Bertino JS, Baron EJ, Arias K (1998). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and guidelines. *Am J Infect Control*. 26: 102-110.
- Yarwood** JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg P (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilm. *J.Bact.* 186(6): 1838-1850
- Yarwood** JM, Schlivert PM (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *J.Clin.Invest.* 112: 1620-1625.
- Yin** S, Daum RS, Boyle-Vavra S (2006). VraSR Two-Component Regulatory System and Its Role in Induction of *pbp2* and *vraSR* Expression by Cell Wall Antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Chem.* 50(1): 336–343.
- Zhang** K, McClure J.A, Elsayed S, Louie T, Conly J.M (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.

Apéndices

Apéndice 1

Pruebas de identificación *S. aureus*

1. Morfología colonial

Las cepas de *S. aureus* fueron recuperadas de viales congelados en leche deslactosada al 5% en placas de agar sangre, donde forman colonias grandes aproximadamente de 3 a 5 mm, opacas, blancas o amarillas debido a la producción de carotenoides, generalmente son β -hemolíticos.

2. Tinción de gram

La tinción de Gram es una tinción diferencial en la cual se emplean cuatro soluciones: un colorante básico, un mordiente, un agente decolorante y un colorante de contraste.

Primero se preparó un frotis de cada una de los aislados de *S. aureus*, posteriormente se fijaron con calor, se tiñeron con cristal violeta durante 1 minuto y se lavaron con agua corriente, se recubrieron con lugol durante 1 minuto y se lavaron nuevamente con agua de la llave, se decoloraron con alcohol- acetona (40-60%) e inmediatamente se lavaron con agua, finalmente se adicionó safranina como colorante de contraste durante 1 minuto, se lavó con agua y se dejó secar al aire, posteriormente se les colocó una gota de aceite de inmersión y fueron observadas bajo el objetivo de 100X del microscopio.

Control de calidad:

Prueba positiva: *Staphylococcus aureus*

Prueba negativa: *Escherichia coli*

3. Prueba de la catalasa.

Esta prueba se basa en la capacidad de la enzima catalasa para descomponer el peróxido de hidrógeno, formándose agua y O₂, el cual se libera en forma de burbujas. Principalmente utilizada para diferenciar entre los géneros *Streptococcus* (-) de *Staphylococcus* (+).

Método en portaobjetos:

Con una asa bacteriológica se tomó una colonia de un cultivo puro de 18 a 24 horas y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio limpio, posteriormente se le adicionó una gota de H₂O₂ al 30%. La producción inmediata de burbujeo (liberación de gas), se consideró prueba positiva y el resultado de cada cepa fue registrado.

Control de calidad:

Prueba positiva: *Staphylococcus aureus*

Prueba negativa: *Streptococcus piogenes*

4. Prueba de la coagulasa en tubo.

Esta prueba se utiliza para identificar la enzima coagulasa, una enzima estable al calor, que resiste temperaturas de hasta 60°C durante 30 minutos, es excretada al medio extracelular por las cepas humanas de *S. aureus* y se inactiva con facilidad por enzimas proteolíticas (proteasas). La coagulasa es una enzima con actividad semejante a la protrombina, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible.

Método:

En un tubo de ensaye con 0.5ml de plasma de conejo diluido 1:3 en caldo Mueller Hinton, previamente probado, se le adicionó una asada de una colonia pura de *S. aureus* de una placa de agar sangre, se rotó suavemente el tubo para lograr la suspensión de las bacterias y se incubó 4 horas a 37°C, con revisiones cada 30 minutos.

Cuando el coágulo no era observado en este período de tiempo, el tubo se dejaba hasta las 24 horas a temperatura ambiente y se registró la formación de coágulos.

Control de calidad:

Prueba positiva: *S. aureus*

Prueba negativa: *S. epidermidis*

5. Fermentación del manitol

A diferencia de otros estafilococos *S. aureus* es capaz de fermentar el manitol. El medio utilizado es agar manitol con sal. Este medio contiene manitol al 1%, NaCl al 7.5%, rojo de fenol y peptonas. La alta concentración de sales inhibe el desarrollo de otros microorganismos (excepto los enterococos) y recupera selectivamente

estafilococos. *S. aureus* fue detectado por la presencia de un halo amarillo alrededor de las colonias aisladas, que indica la producción de ácido a partir del manitol.

6. Crecimiento en caldo BHI con NaCl al 15%.

Se prepararon tubos de ensayo con 5ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) adicionado con 15% de NaCl y se depositó en la pared del tubo una asada de una colonia pura de *S. aureus* proveniente de una placa de agar sangre. Después de 24 horas se registró el crecimiento.

Apéndice 2

Genes accesorios de *Staphylococcus aureus*

Gen	Localización	Producto	Función
<i>sea</i>	Fago	Enterotoxina A	Intoxicación alimentaria
<i>seb</i>	Sapl3	Enterotoxina B	Intoxicación alimentaria
<i>sec</i>	Sapl4	Enterotoxina C	Intoxicación alimentaria
<i>sed</i>	Plásmido	Enterotoxina D	Intoxicación alimentaria
<i>eta</i>	Fago	Exfoliatina A	Síndrome de piel escaldada
<i>etb</i>	Plásmido	Exfoliatina B	Síndrome de piel escaldada
<i>tst</i>	Sapl 1,2	Toxina de choque tóxico	Síndrome de choque tóxico
<i>hla</i>	Cromosoma	Alfa hemolisina	Hemólisis citotóxica
<i>hlb</i>	Cromosoma	Beta hemolisina	Hemólisis citotóxica
<i>hlg</i>	Cromosoma	Gama hemolisina	Hemólisis citotóxica
<i>hld</i>	Cromosoma	Delta hemolisina	Hemólisis citotóxica
<i>lukS/F</i>	Fago	Leucocidina	Lisis de leucocitos
<i>splA-F</i>	Cromosoma	Serin proteasa	Proteasa
<i>ssp</i>	Cromosoma	Proteasa V8	Factor de diseminación
<i>aur</i>	Cromosoma	Metaloproteasa	Factor de diseminación
<i>sspB</i>	Cromosoma	Cisteín proteasa	Factor de diseminación
<i>scp</i>	Cromosoma	Proteasa II	Diseminación, nutrición
<i>geh</i>	Cromosoma	Hidrolasa	Diseminación, nutrición
<i>lip</i>	Cromosoma	Lipasa	Diseminación, nutrición
<i>fme</i>	Cromosoma	FAME	Esterificación de ácidos grasos
<i>plc</i>	Cromosoma	Fosfolipasa C	Esterificación de ácidos grasos
<i>nuc</i>	Cromosoma	Nucleasa	Nutrición
<i>hys</i>	Cromosoma	Hiarulonidasa	Factor de diseminación
<i>coa</i>	Cromosoma	Coagulasa	Factor de aglutinación
<i>sak</i>	Fago	Estafiloquinasa	Activador de
<i>spa</i>	Cromosoma	Proteína A	Anti-inmune
<i>cna</i>	Plásmido	Proteína de unión a colageno	Unión a colageno
<i>fnbA</i>	Cromosoma	Proteína de unión a fibronectina	Unión a fibronectina
<i>fnbB</i>	Cromosoma	Proteína de unión a fibronectina	Unión a fibronectina
<i>clfA</i>	Cromosoma	Factor aglutinación A	Unión a fibrinógeno
<i>clfB</i>	Cromosoma	Factor aglutinación B	Unión a fibrinógeno
Cap5	Cromosoma	Polisacárido capsular tipo 5	Antifagocitosis
Cap8	Cromosoma	Polisacárido capsular tipo 8	Antifagocitosis

Apéndice 3

Valores de susceptibilidad de los antibióticos utilizados, de acuerdo al CLSI

Familia	Antibiótico	Abreviatura	Sensibles($\mu\text{g}/\text{m}$)l	Intermedia($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Resistentes($\mu\text{g}/\text{ml}$)
cefepeno	Cefaclor	CF	≤ 8	16	≥ 32
carbapenemo	Meropenem	MEM	≤ 4	8	≥ 16
Glicopéptidos	Vancomicina	VAN	≤ 4	8 a 16	≥ 32
Aminoglucósido	Gentamicina	GM	≤ 4	8	≥ 16
Macrólido	Claritromicina	CLA	≤ 2	4	≥ 8
Macrólido	Eritromicina	ERY	≤ 0.5	1 a 4	≥ 8
Quinolona	Ciprofloxacino	CIP	≤ 1	2	≥ 4
Lincosamida	Clindamicina	CC	≤ 0.5	1 a 2	≥ 4
inhibidores vía folatos	Trimetopim/ Sulfametoxazol	SXT	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$
Oxazolidinona	Linezolid	LNZ	≤ 4	-	-

Apéndice 4

Método de extracción de DNA Wizard

Procedimiento:

Después de la digestión enzimática con lisostafina, lisozima y proteinasa K, se continúa con la extracción utilizando el kit de extracción de DNA Wizard

Lisis celular:

Adicionar 600 μ L de la solución de lisis núcleo (Mezclar con micropipeta) a 200 μ L de la solución donde se hizo la digestión de las células.

Incubar 5 minutos a 80 °C y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Adicionar 3 μ L de solución RNAasa e incubar a 37 °C por 30 minutos. Después dejar a temperatura ambiente.

Precipitación de proteínas:

Adicionar 200 μ L 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 μ L de isopropanol que este a temperatura ambiente (Mezclar). Refrigerar toda la noche a -20 °C.

Después de la refrigeración, centrifugar 3 min/13,000rpm y decantar el sobrenadante.

Realizar tres lavados con 300 μ L de etanol al 70 % que este a temperatura ambiente, centrifugar 3 min/13,000rpm en cada lavado.

Aspirar el etanol con una micropipeta y secar al aire de 10 a 15 minutos.

Rehidratar el DNA con 100 μ L de 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.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 10 de septiembre del 2008, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Q.F.B. Vicenta Cázares Domínguez.

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Dr. José Arellano Galindo

Dr. Gerardo Aparicio Ozores

Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno