



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Doctorado en Biología Experimental

“Análisis clonal y detección del gen *mec A* y el transposón Tn554 en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes causantes de infección nosocomial en la República Mexicana”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

M. en C. Maria Elena Velazquez Meza

Cotutores:

Dr. Jesús Silva Sánchez

Dr. Humberto González Márquez

México, D.F.

Febrero 2007.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL

Co Director

DR. Jesús Silva Sánchez

Jefe del Departamento de Diagnóstico Epidemiológico
Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas
Instituto Nacional de Salud Pública
jsilva@correo.insp.mx

Co Director

DR. Humberto González Márquez

Profesor Titular "C"
Departamentos de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
hgm@xanum.uam.mx

Asesor

DR. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Profesor Titular "C"
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

Asesor

Dra. Guadalupe Ayala Aguilar.

Jefe del Departamento de Desarrollo Biotecnológico
Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas
Instituto Nacional de Salud Pública
gayala@insp.mx

Asesor

Dr. Edmundo Bonilla González

Profesor Titular "C"
Departamento. Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mundo@xanum.uam.mx

“Los miembros del jurado designados por la Comisión del Posgrado en Biología Experimental, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la presente tesis titulada “Análisis clonal y detección del gen mec A y el transposón Tn554 en cepas de *Staphylococcus aureus* metilino resistentes causantes de infección nosocomial en la República Mexicana” con fecha 15 de Febrero del 2007”.

JURADO DE EXAMEN

Presidente

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal

Dra. Celia Alpuche Aranda

Departamento de Medicina Experimental
Universidad Nacional Autónoma de México

Vocal

Dr. Carlos Eslava Campos

Departamento de Salud Pública
Universidad Nacional Autónoma de México

Secretario

Dra. Guadalupe Ayala Aguilar

Jefe del Departamento de Desarrollo Biotecnológico
Instituto Nacional de Salud Pública

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Departamento de Evaluación de Vacunas, del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, del Instituto Nacional de Salud Pública.

El doctorado en Biología Experimental UAM-I: 309-0 de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, se encuentra actualmente en el Padrón Nacional de Posgrados (PNP) SEP/CONACYT clave: (C/PFPN-2002-35-32).

El presente trabajo fue realizado gracias a la Beca-crédito para estudios de Doctorado otorgada por el CONACYT, Número de registro 176380.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité tutorial por su amistad y apoyo a lo largo de mis estudios.

A los miembros del jurado de examen por los valiosos comentarios y críticas hechas al presente trabajo.

Al Dr. Mario Henry Rodríguez López, por el apoyo que siempre me ha brindado.

Al Dr. Carlos Conde González, por su apoyo en todo momento.

A la Maestra Gabriela Echániz Aviles por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Herminia de Lencastre por las oportunidades brindadas en el Laboratorio de Genética Molecular en Portugal.

Al Dr. Alexander Tomasz por su valiosa invitación al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Rockefeller en Nueva York.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres con respeto admiración y cariño por haberme dado la vida, su ejemplo y su apoyo

A Dios por todas las bendiciones que siempre me ha dado

A mis hermanos Miguel y Manuel por estar a mi lado de manera incondicional

A mi abuelita Agustina por todo su cariño

A Samantha porque sigue siendo el pequeño gran motor que impulsa mi vida

A mis sobrinos: Jesús, Vianey, Sandra y Manuel

A Lilia por su ayuda incondicional

A mis amigos

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
RESUMEN	4
SUMMARY.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 <i>S. aureus</i> COMO FLORA NORMAL Y PATOGENO.....	8
1.2 FACTORES DE VIRULENCIA	9
1.3 <i>S. aureus</i> COMO UN PATOGENO NOSOCOMIAL	10
1.4 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	12
1.5 RESISTENCIA A METICILINA.....	14
1.6 CASETE CROMOSOMAL ESTAFILOCÓCICO.....	14
1.7 ORIGEN DEL ELEMENTO <i>mec</i>	15
1.8 RESISTENCIA A OTROS AGENTES ANTIMICROBIANOS	16
1.9 IMPORTANCIA DE Tn554.....	16
1.10 ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)	17
1.11 TIPIFICACIÓN DEL GEN DE LA PROTEINA A (<i>spa</i>).....	19
1.12 TIPIFICACIÓN POR SECUENCIA DE MULTILOCUS (MLST).....	20
1.13 DISTRIBUCIÓN CLONAL DE SAMR	21
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVO GENERAL.....	24
4. OBJETIVOS PARTICULARES	25
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26

5.1 ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS.....	26
5.2 ANÁLISIS FENOTÍPICO.....	27
5.3 PRUEBA DE COAGULASA.....	27
5.4 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE.....	27
5.5 PRUEBA DE OXACILINA Y VANCOMICINA POR KIRBY-BAUER.....	28
5.6 PRUEBA DE MICRODILUCION EN PLACA PARA VANCOMICINA.....	29
5.7 SUCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR MICRODILUCIÓN EN PLACA (Microscan®).....	29
5.8 ANÁLISIS GENOTÍPICO.....	30
5.9 ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS (PFGE).....	30
5.10 HIBRIDACIÓN CON SONDAS PARA EL GEN <i>mecA</i> Y EL TRANSPOSON Tn554.....	32
5.11 DETECCIÓN DEL PATRÓN DEL CASETE CROMOSOMAL ESTAFILOCÓCICO (SCC <i>mec</i>).....	33
5.12 DETECCIÓN DEL PATRÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA A (<i>spa</i>).....	33
5.13 TIPIFICACIÓN POR SECUENCIA DE MULTILOCUS (MLST).....	34
5.14 ANÁLISIS COMPUTACIONAL DEL PATRÓN DIGITAL.....	34
5.15 CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	35
6. RESULTADOS.....	36
6.1 AISLAMIENTOS BACTERIANOS.....	36
6.2 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE.....	36
6.3 SUSCEPTIBILIDAD A OXACILINA Y VANCOMICINA POR KIRBY- BAUER.....	37

6.4 SUSCEPTIBILIDAD A VANCOMICINA POR MICRODILUCIÓN EN PLACA	37
6.5 SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR MICRODILUCIÓN EN PLACA (Microscan®).....	37
6.6 ANÁLISIS DE PATRONES DE PFGE	38
6.8 PATRÓN DIGITAL	39
6.9 PATRONES DE HIBRIDACIÓN DEL GEN <i>mecA</i> Y EL TRANSPOSON Tn554	40
6.10 PATRÓN DEL CASETE CROMOSOMAL <i>SCCmec</i> , PATRÓN <i>spa</i> y MLST.	40
7. DISCUSIÓN	42
8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	50
9. PERSPECTIVAS.....	51
10. REFERENCIAS.....	52
11. FIGURAS	69
12. CUADROS	77

RESUMEN

En el género *Staphylococcus* existen especies patógenas para el humano que causan una amplia variedad de enfermedades, desde infecciones cutáneas superficiales hasta enfermedades sistémicas potencialmente letales. Las nuevas técnicas de tipificación molecular, han permitido documentar la aparición de clonas de estafilococos resistentes a meticilina, capaces de producir brotes epidémicos en hospitales. Este estudio tuvo como objetivo conocer la distribución de clonas y detectar la presencia del gen *mecA* y el transposón *Tn554* en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SAMR), responsables de infecciones nosocomiales en cuatro hospitales de la República Mexicana. Se analizaron un total de 588 cepas de SAMR por medio de la técnica de campos pulsados (PFGE) y se llevó a cabo por hibridación en membrana la detección del gen *mecA* y del transposón *Tn554*. Se asignaron los tipos del casete cromosomal estafilocócico (*SSCmec*) por medio de PCR y se tipificó la región polimórfica de la proteína A, (*SpaA*). Se realizó la determinación de la secuencia nucleotídica de siete genes esenciales, por medio de la técnica de secuencia de multilocus (MLST). Entre 1997 y 2004 se identificaron cuatro clonas de SAMR designadas como M, A, B y C; cada una de ellas presentó un perfil de resistencia característico. En las cuatro clonas fue identificada una copia del gen *mecA* en un fragmento de 180 y 211 Kb; excepto en los subtipos B1 y B2 que no hibridaron con *mecA*. En las clonas A, B y C se detectaron dos copias del transposón *Tn554* entre los fragmentos de 180-640 Kb, las cepas pertenecientes a la clona M no hibridaron con la

sonda de Tn554. El SCC*mec* tipo IV se encontró en las clonas M y A y el casete tipo II estuvo presente en las clonas B y C, excepto en las cepas B1 y B2 que mostraron una delección de gen *mecA*.y no amplificaron el producto esperado. Cinco diferentes tipos *spa* fueron identificados en este estudio (183: clonas A y M), 33, 204, 275: clona B) y 2: clona C. Las clonas M y A presentaron una secuencia tipo (ST30), la clona B tuvo una secuencia tipo (ST36) excepto B1 y B2 (ST30) y las cepas del patrón C mostraron una secuencia tipo (ST5). Los resultados de comparación con clonas internacionales mostraron que la clona C presentó una similitud del 85.5% con la clona pediátrica y 89.5% con la clona New York-Japón. Las clonas M, A y B tuvieron una elevada similitud con la clona EMRSA-16 (80%).

Nuestro estudio enfatiza la necesidad de continuar monitoreando la diseminación de cepas epidémicas, así como el surgimiento de nuevas clonas en nuestra población. Los mecanismos de diseminación son pobremente entendidos y estudios futuros son necesarios para comprender la dinámica involucrada en la predominancia de clonas únicas de SAMR.

El esclarecimiento de los factores que contribuyen a la superioridad epidémica de las clonas de SAMR pandémicas, los altos niveles de expresión de ciertos genes de virulencia y la habilidad para sobrevivir en el medio ambiente, pueden ser factores de gran importancia para el control y erradicación de los SAMR que circulan actualmente en el mundo.

SUMMARY

The genus *Staphylococcus*, represents, for human beings, a pathogen that can cause an ample variety of diseases, from superficial skin infections to systemic, potentially lethal diseases. The new techniques of molecular classification allow the documentation of the appearance of staphylococcal clones resistant to methicillin, and enable us to study epidemical onsets in hospitals. This study had the aim to analyse the clone distribution and to detect the presence of gen *mecA* and transposon *Tn554* in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), responsible for nosocomial infections in four hospitals in Mexico City. A total of 588 strains of MRSA were analyzed with the help of the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and membrane hybridation, for the detection of gene *mec A* and transposon *Tn554*. The types of the Staphylococcal Chromosomal Cassette (*SCCmec*) were assigned by PCR and the polymorphic region of protein A, (*SpaA*) was classified. The determination of the nucleotide sequencing of seven essential genes was made by the multilocus sequence technique (MLST). Between 1997 and 2004 four MRSA clones designed as M, A, B and C were identified; each one of them presented a characteristic profile of resistance. In the four clones a copy of the gene *mecA* was identified in a fragment of 180 and 211 Kb; except from the subtypes B1 and B2 which did not hybridized with *mecA*. In clones A, B, and C two copies of the transposon *Tn554* between the fragments of 180-640Kb were detected, the strains corresponding to clone M did not hybridized with the probe of *Tn554*. The *SCCmec* type IV was found in the clones M and A in the cassette type II the

clones B and C, except from the strains B1 and B2 which showed a deletion of gene *mecA* and did not amplify the expected product. Five different types of *spa* were identified in this study (183: clones A and M), 33, 204, 275: clone B) and 2: clone C. The clones M and A presented a sequence of type (ST30), clone B had a sequence type (ST36) except B1 and B2 (ST30) and the strains of pattern C showed a sequence type (ST5). The results of the comparison with international clones showed that clone C presented a similarity of 85.5% with the pediatric clone and 89.5% with the New York – Japan clone. The clones M, A and B had an elevated similarity with the clone EMRSA-16 (80%).

Our study emphasizes the necessity of continuing to monitor the dissemination of epidemical strains, as well as the appearance of new clones in our population. The mechanisms of the dissemination are poorly understood and future studies are necessary to understand the dynamic involved in the predominance of unique MRSA clones.

The clarification of the factors which contribute to the epidemical superiority of the pandemic clones of MRSA, to the high levels of expression of certain virulence genes and to the ability to survive in the environment, can be factors of great importance for the control and excision of the MRSA which momentarily circulate in the world.

1. INTRODUCCIÓN

Los estafilococos son cocos Gram positivos que miden cerca de 1µm de diámetro, no móviles, aerobios facultativos y fermentadores de glucosa. El género *Staphylococcus* contiene más de 30 especies diferentes y muchas de estas especies son habitantes naturales de la piel y membranas mucosas, no tienen otros hábitat importantes excepto cuando están involucrados en infecciones (1).

Estos microorganismos son resistentes a altas temperaturas y a muchos desinfectantes; toleran altas concentraciones de sal, característica utilizada para su enriquecimiento selectivo (2,3). En medios suplementados, los estafilococos crecen bien en rangos de pH de 4.8 a 9.4 y a temperaturas de 25 a 43 °C. El color amarillo clásico de las colonias de *S. aureus* es debido a la producción de carotenoides, sin embargo variantes no pigmentadas se presentan frecuentemente en muchas cepas. De forma rutinaria, *S. aureus* es identificado por reacciones positivas en las siguientes pruebas: a) catalasa, b) coagulasa, c) fermentación de manitol y d) prueba de DNAsa (4).

1.1 *S. aureus* COMO FLORA NORMAL Y PATOGENO

Las etapas de las infecciones causadas por *S. aureus* pueden resumirse de la siguiente manera: Frecuentemente neonatos, niños y adultos pueden ser colonizados por *S. aureus* y portar el microorganismo generalmente en fosas nasales. Las membranas mucosas o la piel son barreras mecánicas contra invasiones locales, si esta barrera es

interrumpida por un trauma o una cirugía, *S. aureus* es un patógeno oportunista que puede acceder al interior del tejido provocando una lesión local. Debido a su amplia versatilidad esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro: infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico (5,6).

1.2 FACTORES DE VIRULENCIA

El éxito de la colonización y producción de enfermedades por *S. aureus* es debido a la expresión de factores de virulencia que participan en la adhesión a la célula huésped, adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune del huésped. Los factores de virulencia pueden ser clasificados en tres categorías (7, 8) : (i) Factores involucrados en la adherencia de la célula huésped o matriz extracelular, como son las proteínas de unión al fibrinógeno, proteínas de unión a la fibronectina, proteínas de unión al colágeno y coagulasa (ii) Factores involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), SEA-SEE, SEG-J, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO; la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares, tipos 1, 5 y 8; (iii) Factores involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la α toxina y la β , γ , δ hemolisinas, (9,10,11). Dos operones descritos recientemente están involucrados en la regulación global de la expresión de factores de virulencia: el locus *agr* (genes

accesorios de regulación) clasificado en cuatro grupos I-IV y el locus *sar* (regulador estafilocócico accesorio) (12,13).

1.3 *S. aureus* COMO UN PATOGENO NOSOCOMIAL

En los Estados Unidos, *S. aureus* ocupa el segundo lugar después de los estafilococos coagulasa negativa como causa de bacteriemia adquirida en el hospital y es una causa importante de muerte en las infecciones (14,15). En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE por sus siglas en español) reportó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre 5 y 70% y los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados (50%) (16). Con datos provenientes de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades, esta misma red reportó que en el periodo de 1997-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad. El hospital de Pediatría del Centro Médico en México, reportó un franco predominio de *S. aureus* relacionado con bacteriemias nosocomiales (17). Una revisión retrospectiva de 23 años sobre las infecciones intrahospitalarias en un hospital pediátrico en Guadalajara, México, reconoce que actualmente el género *Staphylococcus* tiene una prevalencia del 36% en esas infecciones (18). En México, diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales indicaron que del 8.3 al 36% de esas infecciones fueron atribuibles a *S. aureus* (19,20, 21, 22).

S. aureus puede ser introducido al hospital a través de pacientes colonizados, infectados o por el personal médico colonizado, los pacientes colonizados representan la principal fuente de contaminación de *S. aureus* en los hospitales (23,24). Dentro de los factores que afectan el éxito de la transmisión nosocomial de *S. aureus* se encuentran los siguientes: características fenotípicas y genotípicas de las cepas, factores del huésped, esquemas de tratamiento antimicrobiano y medidas de control de las infecciones implementadas en las instituciones (25). Algunas cepas de *S. aureus*, denominadas epidémicas, parecen tener la capacidad de distribuirse de manera exitosa dentro de los hospitales y causar infecciones serias en los pacientes. Los factores involucrados en la epidemicidad son poco claros. Los factores que incrementan la probabilidad de adquirir *S. aureus* en hospitales incluyen: hospitalización prolongada, procedimientos prequirúrgicos, presencia de catéteres o prótesis y la permanencia en lugares de alto riesgo tales como unidades de cuidados intensivos, sala de neonatos y unidades prequirúrgicas (26).

Las medidas de control y prevención de las infecciones de *S. aureus* están basadas en estrategias para evitar la transmisión: i) reforzamiento del lavado de manos y procedimientos de desinfección, ii) tomas de muestras en pacientes y personal del hospital, iii) establecimiento de barreras de precaución o aislamiento estricto de pacientes infectados, registro del estado de portador del personal médico e identificación de reservorios de cepas nosocomiales así como estudios epidemiológicos de las mismas (27, 28).

1.4 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

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 infecciones ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, para 1946 en Inglaterra se observó que aproximadamente el 60% de los aislamientos de estafilococos fueron resistentes a penicilina y para mediados de 1950 el número de aislamientos de *S. aureus* mostraron niveles más elevados de resistencia. Los primeros aislamientos clínicos de *S. aureus* multiresistentes fueron recobrados en 1957 y a principios de 1960 los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles (29, 30).

La metilina es un derivado semi-sintético de la penicilina, la droga fue introducida en Europa en 1959, un año más tarde la primera cepa de *S. aureus* metilino resistente (SAMR) fue detectada y en 1963 se reportó el primer brote nosocomial causado por SAMR; desde entonces cepas de *S. aureus* metilino resistentes han sido reportadas en todo el mundo (31).

El Sistema Nacional de Infecciones Nosocomiales (NNIS por sus siglas en inglés), en los Estados Unidos, reporta un incremento de SAMR en las unidades de cuidados intensivos del 19.7% en 1980 al 59.4% entre el 2000 y 2002. Para algunos hospitales la frecuencia de resistencia se ha reportado hasta en el 80% de los aislamientos (15). En Europa los hospitales escandinavos reportan una frecuencia menor

al 2%, mientras que en los hospitales del Mediterráneo el porcentaje es mayor (40%) (31).

El fenotipo que se ha visto más frecuentemente asociado con la persistencia de cepas de *S. aureus* en los hospitales es el de resistencia a meticilina. La gran mayoría de los SAMR no solo son resistentes a todos los β -lactámicos sino también son resistentes a otros antibióticos. Estos patrones de resistencia limitan las opciones terapéuticas contra las infecciones de SAMR, incluidos la vancomicina y teicoplanina que son las últimas alternativas terapéuticas. Las primeras cepa de *S. aureus* con susceptibilidad disminuida a la vancomicina fueron reportadas en Japón y en Estados Unidos en los años 90 y a partir de entonces han surgido en la literatura un sin número de reportes que documentan la aparición de cepas de *S. aureus* vancomicina resistentes (32, 33, 34, 35).

En México existe un número limitado de estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana en SAMR. En 1993, en el Hospital General de León Guanajuato, se reportó una resistencia global a meticilina del 24.1% (36). Resultados obtenidos en el Hospital Civil de Guadalajara, indicaron un incremento en la resistencia a oxacilina en *S. aureus* del 7% en 1989 a 20% en 1998 (37). Un estudio realizado entre 1998 y 1999 en un hospital de tercer nivel en México reportó una frecuencia de resistencia a meticilina en *S. aureus* del 14.2% (38).

1.5 RESISTENCIA A METICILINA

El blanco primario de los antibióticos β -lactámicos son las proteínas de unión a la penicilina (PBP), las cuales se encuentran ancladas en la membrana citoplasmática y están involucradas en la biosíntesis del peptidoglicano. El elemento central de la resistencia a meticilina en *S. aureus* es la adquisición del gen *mecA*, el cual no es endógeno de *S. aureus* y está integrado en el cromosoma. El gen *mecA* codifica para una PBP de 78KDa (PBP2A), esta proteína presenta baja afinidad para los antibióticos β -lactámicos (39, 40, 41, 42).

1.6 CASETE CROMOSOMAL ESTAFILOCÓCICO

Un estudio llevado al cabo en 1996 utilizando cepas prototipo aisladas en diferentes continentes, aportó las primeras evidencias de la existencia de tres tipos de casete cromosomal estafilocócico (SCC*mec*): tipo I (34 Kb) característico de las primera cepas aisladas en 1961 en Reino Unido (NCTC 10442), tipo II (52 Kb) característico de una cepa de SAMR aislada en 1982 en Japón (N315) y el tipo III (66 Kb) característico de una cepa de SAMR aislada en 1985 en Nueva Zelanda (82/2082) (43,44). Recientemente fue descrito un cuarto tipo de SCC*mec* de 20 Kb, éste se encuentra asociado a los aislamientos de SAMR pediátricos y de la comunidad (45,46). Estudios recientes indican que los tipos II y IV se encuentran circulando en cepas de SAMR en México (47). Figura 1

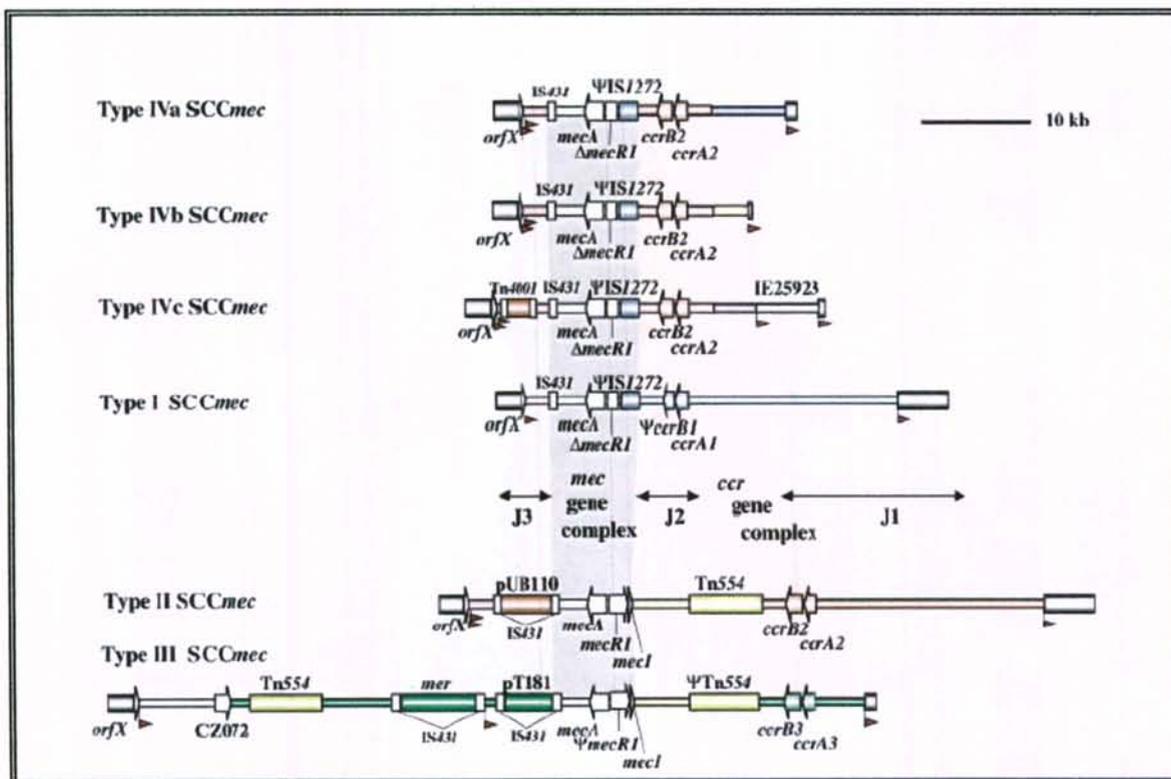


Figura 1. Representación esquemática de los tipos de casete cromosomal estafilocócico *SCC_{mec}* (48)

1.7 ORIGEN DEL ELEMENTO *mec*

Algunas evidencias indican que los estafilococos coagulasa negativos (SCN) son el origen del gen *mecA*. La comparación de las secuencias de *mecA* y de las regiones que lo flanquean, indican que estas secuencias están altamente conservadas entre las especies de estafilococos. Una región homóloga al gen *mecA* fue identificada en aislamientos de *Staphylococcus sciuri* (49, 50,51).

1.8 RESISTENCIA A OTROS AGENTES ANTIMICROBIANOS

La selección de cepas de *S. aureus* multiresistentes representa una respuesta secuencial a la presión selectiva impuesta por la misma terapia antimicrobiana. Sin embargo, la acumulación y diseminación de esta resistencia en *S. aureus* se debe al intercambio de determinantes de resistencia preexistente portados por elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones (52).

1.9 IMPORTANCIA DE Tn554

El transposón Tn554 (Fig. 2) se encuentra en el cromosoma de los estafilococos y tiene un tamaño de 6,691 pb; está formado por seis regiones: *tnpA*, *tnpB*, *tnpC*, *spc*, *ermA* y ORF. Las regiones *tnpA*, *tnpB*, *tnpC* son esenciales para la transposición; *spc* codifica para la resistencia a espectinomicina y funciona como marcador molecular de resistencia mientras que *erm A* codifica para la resistencia a macrólidos (52).

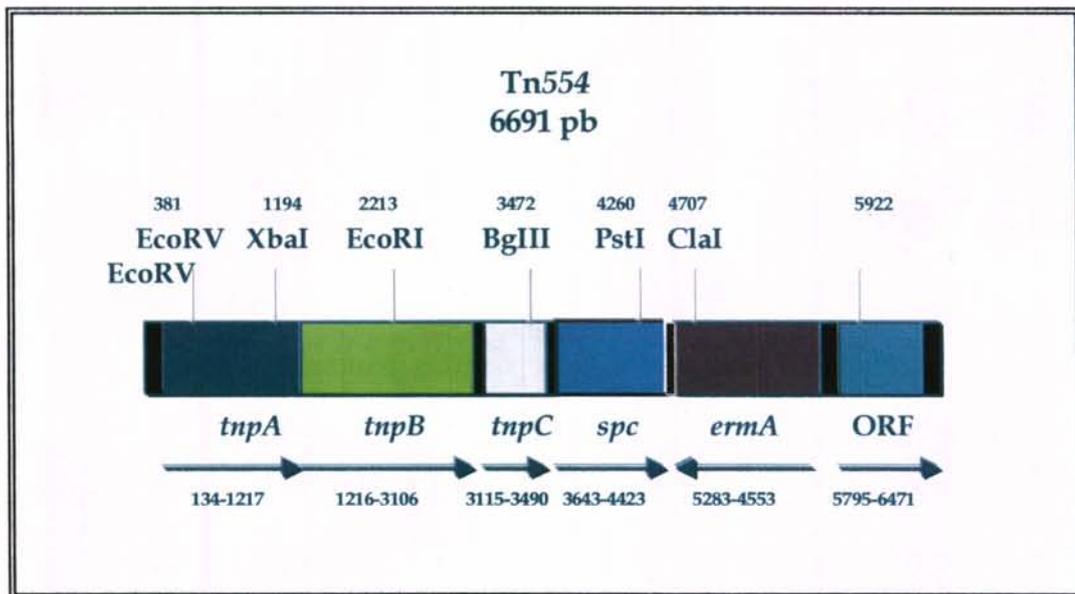


Figura 2. Representación esquemática del transposón Tn554 presente en las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes.

1.10 ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)

La electroforesis de campos pulsados ha sido considerada como una técnica de tipificación capaz de resolver un número manejable de fragmentos de restricción que puedan ser usados en la evaluación epidemiológica de patógenos nosocomiales. La utilización de esta técnica permite agrupar las cepas bacterianas en grupos clonales, una clona se define como un grupo de bacterias que provienen de un ancestro común. Los criterios de interpretación para los patrones electroforéticos generados por este sistema son los siguientes: **i) Indistinguible:** aislamientos cuyos patrones de restricción tienen el mismo número de bandas y las bandas son aparentemente del mismo tamaño. La interpretación epidemiológica de estos resultados, es que los aislamientos son todos considerados como representantes de la misma clona. **ii) Estrechamente relacionados:**

Los aislamientos son considerados estrechamente relacionados si sus patrones de PFGE son diferentes a los de la cepa patrón, tales cambios típicamente resultan en dos a tres bandas diferentes. **iii) Posiblemente relacionados:** Estos aislamientos son considerados como posiblemente relacionados si su patrón de PFGE es diferente al de la cepa original, lo cual puede estar relacionado con dos eventos genéticos independientes. Mientras estos aislamientos pueden tener el mismo linaje genético como el de la cepa brote, genéticamente ellos no están estrechamente relacionados. Tales variaciones han sido observadas entre aislamientos colectados en periodos largos de tiempo (≥ 6 meses) **iv) No relacionados:** son aislamientos que son considerados no relacionados si su patrón de PFGE es diferente al de la cepa tipo. Estos cambios están relacionados con tres o más eventos genéticos independientes, generando siete o más bandas de diferencia (Fig. 3) (53).

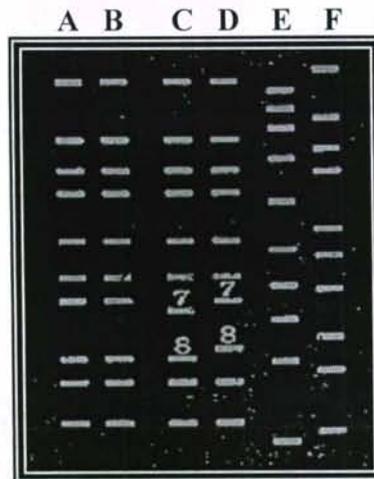


Figura 3. Criterios de interpretación de la electroforesis de campos pulsados (PFGE). A-B, patrones indistinguibles; C-D, patrones estrechamente relacionados; E-F, patrones no relacionados.

1.11 TIPIFICACIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA A (*spa*)

Es un método molecular importante para la tipificación de las cepas de SAMR, este se basa en la secuenciación de una pequeña región polimórfica del gen de la proteína A (*spa*). (Fig. 4) Esta región consiste de un número variable de repetidas de 24 pb. La diversidad de esta región es debida a deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales. La existencia de regiones conservadas rodeando el sitio variable permite el uso de oligos para la amplificación por PCR y tipificación de la secuencia (54) El tipo *spa* es asignado por la base de datos Egenomics. (<http://tools.eugenomics.com/>><http://tools.eugenomics.com/>).

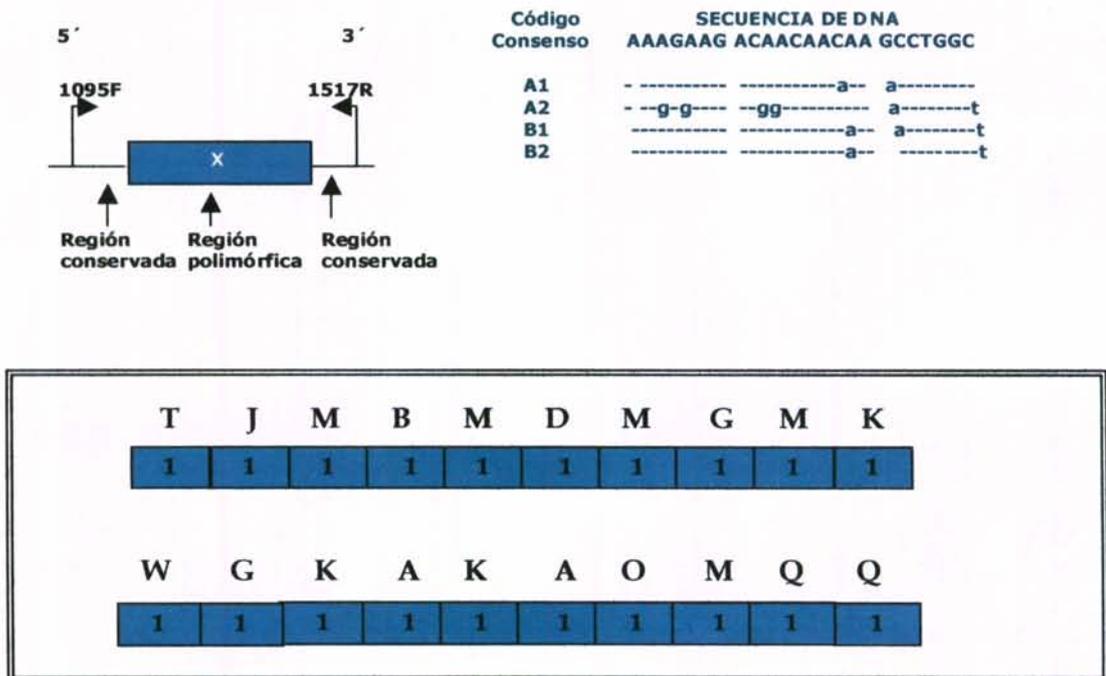


Figura 4. Representación esquemática de la tipificación por secuencia de la región variable del gen de la proteína A de *S. aureus* (*spa*). Las letras representan un código alfabético designado arbitrariamente. Los códigos repetidos son derivados de la organización de repetidas individuales.

1.12 TIPIFICACIÓN POR SECUENCIA DE MULTILOCUS (MLST)

Es un método molecular importante para la caracterización de diferentes géneros bacterianos y está basado en la secuencia de fragmentos internos de siete genes esenciales en la bacteria, que presentan tamaños de 450 a 500 pb. Para cada fragmento del gen las diferencias en las secuencias son asignadas como alelos distintos y cada aislamiento es definido por los alelos de los siete genes denominado perfil alélico o secuencia tipo (ST) (Fig. 5); los aislamientos que tienen el mismo ST son considerados miembros de la misma clona. La ventaja más importante del MLST es la facilidad de comparar vía electrónica en un banco de datos los resultados obtenidos en diferentes estudios (55, 56).

ST	<i>arcc</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmK</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>	
1	1	1	1	1	1	1	1	
2	1	2	1	1	1	1	1	Variación en un solo locus
3	1	2	1	1	3	1	1	Doble variación

Figura 5. Representación esquemática de la tipificación por secuencia de multilocus (MLST). Los genes (carbamato cinasa (*arc*), shikimato deshidrogenasa (*aroE*), glicerol cinasa (*glpF*), guanilato cinasa (*gmK*), fosfato acetil transferasa (*pta*), triosafosfato isomerasa (*tpi*) y acetil transferasa (*yqiL*) esenciales en la bacteria son utilizados para la determinación de la secuencia tipo (ST), asignada por la base de datos del MLST (<http://www.mlst.net>)

1.13 DISTRIBUCIÓN CLONAL DE SAMR

Los procedimientos de tipificación pueden jugar un papel importante en el diagnóstico y manejo de las infecciones estafilocócicas, para ello en la actualidad existen diversos métodos de tipificación: serotipificación, electroforesis por multilocus enzimático, polimorfismo de fragmentos largos de restricción, ribotipificación, polimorfismos de la vecindad del gen *mecA*, electroforesis de campos pulsados (PFGE), tipificación por secuencia de multilocus (MLST) y variabilidad del gen de la proteína A (*spa*) pero hasta el momento ninguno de estos métodos ha sido adoptado como estándar internacional (53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63)

La epidemiología mundial requiere una colección de cepas de gran tamaño representativa de todos los SAMR que circulan en diferentes áreas geográficas y en diferentes periodos. Dos esfuerzos independientes y a gran escala han sido descritos recientemente para establecer las relaciones epidemiológicas de los SAMR. El primero fue realizado por el proyecto CEM/NET (Centro de Epidemiología Molecular (CEM) organizado por una red de colaboración coordinada por la Dra. Herminia de Lencastre. y el Dr. Alexander Tomasz de la Universidad de Rockefeller en Nueva York (64). El estudio incluyó aislamientos de Europa, América Latina, Estados Unidos, Japón, Taiwán, China y los primeros aislamientos de SAMR recuperados en Dinamarca e Inglaterra (50, 59, 61). Esta tipificación molecular se realizó a más de 3,000 cepas de SAMR y dio como resultado la identificación de cinco clonas pandémicas denominadas: Clona Ibérica (65, 66, 67, 68, 69, 70, 71) Clona Brasileña (72, 73, 74, 75, 76, 77) Clona

Húngara (78, 79, 80) Clona Nueva York/ Japón (71, 81, 82, 47) y Clona Pediátrica (71, 75, 83, 84, 85, 86, 87). El segundo esfuerzo estuvo basado en el análisis de clonas de SAMR por MLST y la creación de una base de datos central (<http://www.mlst.net>) amplia y comparable (55). Cuadro 1

2. HIPÓTESIS

Las clonas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes causantes de infecciones nosocomiales pueden ser únicas para cada hospital, encontrarse relacionadas con clonas de otros hospitales o pertenecer a grupos de SAMR de distribución internacional.

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar la distribución de clonas y detectar la presencia del gen *mecA* y el transposón *Tn554* en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes, responsables de infecciones nosocomiales en cuatro hospitales de la República Mexicana (1997-2004)

4. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar la recolección de aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* en los hospitales participantes.
2. Identificar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *S. aureus* recolectadas.
3. Identificar las clonas de SAMR en los hospitales estudiados y correlacionarlas con la susceptibilidad antimicrobiana.
4. Realizar la hibridación del gen *mecA* y el transposón Tn554 en los aislamientos clínicos resistentes a meticilina.
5. Determinar la secuencia de multilocus (MLST) y el patrón del gen *spa* en cepas de SAMR representantes de los grupos clonales identificados.
6. Comparar los diferentes marcadores moleculares de las cepas estudiadas con las clonas de distribución internacional.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS

Las cepas de SAMR se obtuvieron de cuatro hospitales (la selección de los hospitales se hizo por conveniencia) dos están localizados en la Ciudad de México, D. F.: Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, Siglo XXI (H-CMN) e Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” (H-CAR) y dos en provincia: Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” (H-GUA) y Hospital Universitario de Monterrey (H-MON); localizados a 989Km y 580Km de distancia de la Ciudad de México respectivamente. Las cuatro instituciones son de tercer nivel y reciben pacientes de diferentes estados de la república. Cuadro 2.

Se analizaron un total de 588 cepas de *S. aureus*, (Cuadro 2). Los aislamientos, uno por paciente fueron colectados de diversas fuentes clínicas (secreción de herida, sangre, secreción bronquial, catéter, líquido pleural, líquido peritoneal, orina y líquido cefalorraquídeo) y de diferentes servicios (Unidad de cuidados intensivos, medicina interna, traumatología, infectología, cirugía pediátrica, cirugía general, neurocirugía, medicina legal, nefrología, gastroenterología y otros).

5.2 ANÁLISIS FENOTÍPICO

El análisis fenotípico comprendió la siembra y resiembra en agar de soya tripticasa de todas las cepas de estafilococos colectadas en los cuatro hospitales participantes, así como las pruebas de coagulasa, oxacilina y vancomicina las cepas que resultaron oxacilina resistente y coagulasa positiva fueron identificadas hasta especie por medio del sistema automatizado MicroScan® (DADE-BEHRING), combo tipo 12, siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.3 PRUEBA DE COAGULASA

S. aureus producen la enzima extracelular que coagula el plasma humano. Esta enzima coagula al fibrinógeno en presencia de un factor reactor de la coagulasa que puede derivar de la protrombina. La prueba se realizó de la siguiente manera: se colocó una asada de cultivo bacteriano en un tubo de 13x100 con 0.5 ml. de plasma humano (mezcla de por lo menos cuatro plasmas) posteriormente se incubó durante 4h a 37°C, los resultados de interpretación fueron los siguientes: todas las cepas que coagularon el plasma se consideraron de manera presuntiva como *S. aureus* (coagulasa +), los resultados en donde no hubo formación de coágulo se consideraron como negativos.

5.4 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE

Para confirmar la especie de los aislamientos que fueron coagulasa positiva se utilizó el sistema automatizado MicroScan® positivo combo 12, este consiste en una placa comercial de 96 pozos que contiene bioquímicas específicas para la identificación del

género estafilococo: Cristal Violeta (CV), Nitratos (NIT), Novobiocina (NOV), Glicosidasas (PGR), Indoxil Fosfatasa (IDX), Voges-Poskauer (VP), Optoquina (OPT), Fosfatasa (PHO), Bilis Esculina (BE), Arginina (ARG), Urea (URE), Manosa (MAN) y Lactosa (LAC). La identificación está basada en la detección de cambios de pH, por la utilización del sustrato después de 16 a 24 h de incubación a 37°C.

5.5 PRUEBA DE OXACILINA Y VANCOMICINA POR KIRBY-BAUER

Para la prueba de oxacilina y vancomicina se realizó una suspensión bacteriana en solución salina a una densidad óptica de 0.5 del estándar de McFarland (estándar de turbidez bacteriana equivalente a 1×10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro), a partir del cultivo estandarizado se inoculó con un hisopo una placa de agar Mueller-Hinton, posteriormente se colocó en el centro de la placa un disco de oxacilina de 1 µg o vancomicina de 30 µg y se incubó de 18-24 h a 37°C, la interpretación de resultados se realizó de acuerdo a los lineamientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), (oxacilina: resistente ≤ 10 mm, intermedio 11-12 mm y sensible ≥ 13 mm; vancomicina: sensible ≥ 15 mm); las cepas de *S. aureus* American Type Culture Collection (ATCC)[®] 25923, *S. aureus* ATCC[®] 29212 y *Echerichia coli* ATCC[®] 35218 fueron utilizadas como controles de acuerdo a las recomendaciones del NCCLS(88).

5.6 PRUEBA DE MICRODILUCION EN PLACA PARA VANCOMICINA

Las cepas (n=93) cuyos valores de corte por Kirby-Bauer resultaron con un halo de inhibición de 13 a 15mm, se analizaron por el método de microdilución en placa para determinar la concentración mínima inhibitoria a vancomicina. Se realizó una suspensión bacteriana en caldo Mueller-Hinton a una densidad óptica de 0.5 del estándar de McFarland, 50µl del inóculo estandarizado y 50µl de cada dilución de antibiótico (0.06-64µg/ml) fueron depositados por pozo, la placa de 96 pozos se incubó de 18-24 h a 37°C, la interpretación de resultados se llevo a cabo de acuerdo a los lineamientos del NCCLS, (sensible $\leq 4\mu\text{g/ml}$, resistente $>4\mu\text{g/ml}$) las cepas *S. aureus* ATCC[®] 29213 y *Enterococcus faecalis* 29212 fueron utilizadas como controles de acuerdo a las recomendaciones del NCCLS (88).

5.7 SUCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR MICRODILUCIÓN EN PLACA (MICROSCAN[®])

Con la finalidad de confirmar los resultados de resistencia a oxacilina y vancomicina obtenidos por Kirby-Bauer, así como la obtención de los perfiles de resistencia a diferentes grupos de antibióticos, se realizó a todos los aislamientos (n=588) la determinación antimicrobiana automatizada por medio del sistema MicroScan[®]. Para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana el panel de MicroScan[®] incluye microdiluciones de antibióticos deshidratados. Se realizó un inóculo bacteriano en solución salina con una turbidez de 0.5 del estándar de McFarland,

100µl del inóculo estandarizado se colocó en cada pozo. A todas las cepas de SAMR se les determinó la concentración mínima inhibitoria a los siguientes 17 antibióticos: amoxicilina (AUG), ampicilina (A), cefalotina (CF), cefazolina (CFZ), cefotaxima (CFT), ciprofloxacina (CIP), claritromicina (CLA), clindamicina (CD), eritromicina (ERY), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), oxacilina (OX), penicilina (P), rifampicina (RIF), tetraciclina (TE), trimetoprim/sulfametoxazol (T/S) y vancomicina (VA). Cada uno de estos antibióticos tiene rangos de sensibilidad de acuerdo al NCCLS; las cepas *S. aureus* ATCC[®] 29213 y *Enterococcus faecalis* 29212 fueron utilizadas como controles de acuerdo a las recomendaciones del NCCLS (88).

5.8 ANÁLISIS GENOTÍPICO

Las 588 cepas de SAMR colectadas en este estudio fueron analizadas por electroforesis en gel de campos pulsados (del idioma inglés PFGE), la detección por hibridación del gen *mecA* y el transposón Tn554 se realizó en todas las cepas. La detección del casete cromosomal estafilocócico SCC*mec*, la determinación del patrón *spa* y de la secuencia tipo MLST, se realizó a cepas representativas de cada patrón clonal.

5.9 ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)

La preparación de DNA para la electroforesis en campos pulsados se llevó a cabo de la siguiente manera: a partir de un cultivo puro de 24 h se inóculó una colonia de estafilococos en 5 ml de caldo de soya tripticasa (TSB) y se incubó a 37°C durante 18 h, 500µl del cultivo bacteriano se centrifugó a 12 000 g por 5 minutos, las células se

resuspendieron en un 1 ml de solución de PIV (Tris 1 M pH 8.0, y NaCl 5 M) y se centrifugaron por 5 min. a 14 000 g las pastilla obtenidas se resuspendieron en 200 μ l de PIV, posteriormente se ajustó la concentración bacteriana a una D.O. de 0.05-0.25 con una longitud de onda de 620 nm.

En un tubo cónico tipo Eppendorf de 2ml se colocaron 150 μ l de la suspensión bacteriana previamente ajustada más 150 μ l de agarosa Sea Plaque al 1.5% (FMC BIOPRODUCTS); se colocaron 20 μ l de la suspensión por disco, los discos se colocaron en 1 ml de solución EC-lisis (Tris 1M pH 8.0, NaCl 5 M, EDTA 0.5M pH 8.0, desoxicolato de sodio 0.2%, N- lauril sarcosil 0.5 %, 50 μ g/ml RNAasa (Sigma), 100 μ g/ml lisozima (Sigma) y 50 μ g/ml lisostafina (Sigma) y se incubaron a 37° C por 3 horas, transcurrido el tiempo de la primera lisis se decantó esta solución y se adicionó 1 ml de solución de ESP (EDTA 0.5 M pH 9.0, N-lauril sarcosil 1%, 1mg/ml proteinasa K) y se incubó a 50°C toda la noche, la solución de ESP se decantó y se adicionaron 13 ml de TE 1X (Tris 10mM pH 7.5, EDTA 1mM), los discos se lavaron 5 veces con TE 1X y se conservaron en solución de TE 1X a 4°C.

Para cada cepa por analizar se colocó un disco en un tubo Eppendorf con 50 μ l de amortiguador de restricción Pre*Sma* (Tris 6mM pH 8, cloruro de potasio 20mM y cloruro de magnesio 6mM) a 25°C, se utilizaron 15U de enzima *Sma I* (BIOLABS) por muestra y se incubó toda la noche a 25 °C.

Se preparó un gel de agarosa Seaken LE (FMC BIOPRODUCTS) al 1% en amortiguador de TBE 0.5X (Tris Borato y EDTA). Los discos que contienen el DNA de las muestras, las cepas controles (HU25, HPV107, HDE288, BK2464, JP27 y 96/32010, representativas de las clonas: Brasileña, Ibérica, Pediátrica, NY/Japón-USA, NY/Japón-Japón y EMRSA-16-Reino Unido respectivamente) Cuadro 4 y el marcador de peso molecular lambda (BIOLABS) se depositaron en los pozos del gel. Las cepas controles pertenecen a la colección del laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Tecnología Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa. Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes: temperatura 14°C, 6V/cm², tiempo inicial de pulso 1 seg., tiempo final de pulso 30 seg., tiempo de corrida 23 h. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5µg/ml) y fotografiados con película polaroid 665 y 667.

Los criterios de interpretación utilizados para el análisis de los patrones de bandeo del DNA fueron los establecidos por Tenover (53).

5.10 HIBRIDACIÓN CON SONDAS PARA EL GEN *mecA* Y EL TRANSPOSON Tn554

La transferencia del DNA se llevó a cabo utilizando membranas de Nylon, Hybond N⁺ (Amersham) con un aparato de vacío (Vaccu-blot, Pharmacia). Las sondas de DNA empleadas fueron generadas por productos de restricción de un fragmento interno *Pst*I -*Xba*I de 1.96 Kb (del nucleótido 478 al nucleótido 2440) del gen *mecA* clonado en pTZ19 (89) y un fragmento *Eco*RV de 5.5 Kb (del nucleótido 381 al nucleótido 5922) del transposón Tn554 clonado en el vector pBlueScript II (59). Las

sondas se marcaron usando el sistema no radiactivo ECL Random Primer Labeling System (Amersham) la pre-hibridación e hibridación fueron realizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.11 DETECCIÓN DEL PATRÓN DEL CASETE CROMOSOMAL ESTAFILOCÓCICO (SCC*mec*)

Se analizaron cepas representativas de cada tipo y subtipo clonal; (n=40) las cepas COL, PER34, BK2464, ANS46, HU25 y HDE288 fueron utilizadas como controles de los diferentes SCC*mec* descritos. La detección de los tipos de casete cromosomal *mec* fueron determinados por medio de la amplificación de la región *mec* por PCR múltiple, de acuerdo a Oliveira y de Lencastre. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: CIF2F2- CIF2R2; KDPFI-KDPF1; MECI P2-MECIP3; DCSF2-DCSRI; RIF4F3-RIF4R9; RIF5F10-RIF5R13; IS431P4-Pub110R1; IS431P4-Pt181R1 y MECAP4-MECAP7 (90).

5.12 DETECCIÓN DEL PATRÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA A (*spa*)

El patrón del gen de la proteína A (*spa*) fue determinado en cepas representativa de cada tipo y subtipo clonal, se hizo la amplificación por PCR del gen *spa* de acuerdo a la metodología propuesta por Shopsin utilizando los iniciadores *spaAF1*, 5'-GAC GAT CCT TCG GTG AGC-3' y *spaAR1*, 5'CAG CAG TAG TGC CGT TTG C-3'. (54). La secuencia de ambas cadenas de DNA fue determinada en Genewiz, Inc. New Jersey,

USA. El programa DNASTar propiedad de la Universidad de Rockefeller en Nueva York, fue utilizado para el alineamiento y análisis de las secuencias de DNA. Los tipos *spa* fueron asignados por la base de datos de Egenomics.

(<http://tools.egenomics.com/>><http://tools.egenomics.com/>).

5.13 TIPIFICACIÓN POR SECUENCIA DE MULTILOCUS (MLST)

La tipificación por secuencia de multilocus (MLST) se realizó a un grupo de cepas representativas de cada patrón clonal, generado a partir del análisis de los patrones de PFGE. Los genes (carbamato cinasa (*arc*), shikimato deshidrogenasa (*aroE*), glicerol cinasa (*glpF*), guanilato cinasa (*gmk*), fosfato acetil transferasa (*pta*), triosafosfato isomerasa (*tpi*) y acetil transferasa (*yquiL*) esenciales en la bacteria fueron los utilizados para la determinación de la secuencia tipo (ST), asignada por la base de datos del MLST (<http://www.mlst.net>) (55). La secuencia de ambas hebras de DNA fue determinada en Genewiz, Inc. New Jersey, USA. El programa DNASTar propiedad de la Universidad de Rockefeller en Nueva York, fue utilizado para el alineamiento y análisis de las secuencias de DNA.

5.14 ANÁLISIS COMPUTACIONAL DEL PATRÓN DIGITAL

Con la finalidad de establecer el coeficiente de similitud entre las diferentes clonas y dentro de cada grupo clonal se analizaron los patrones de bandeo obtenidos por PFGE utilizando el programa NTSYSpc, version 2.0.2.11 (Applied Biostatistics Inc. Nueva York E.U). Para normalizar los perfiles electroforéticos, cada gel incluyó la cepa de referencia NCTC 8325 y el marcador de peso molecular lambda. Para el análisis de

grupos se calculó el coeficiente de Dice por medio de una matriz de similitud que fue transformada dentro de grupos con promedios aritméticos (del inglés Unweighted pair-group method, arithmetic average UPGMA), el sistema permite establecer un coeficiente de similitud que va de 0.01-1.00 equivalente a 0.01 al 100%(91)

5.15 CONSERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas de SAMR fueron conservadas a -70°C en medio de Todd-Hewitt (DIFCO) con suero de conejo al 5% y glicerol al 90%.

6. RESULTADOS

6.1 AISLAMIENTOS BACTERIANOS

De los 588 aislamientos de SAMR estudiados 213 (36.2%) fueron de secreción de herida; 129 (21.9%) de sangre; 70 (11.9%) de secreción bronquial; 55 (9.3%) de catéter; 28 (4.7%) de líquido peritoneal; 27 (4.6%) de líquido cefalorraquídeo; 16 (2.7%) de líquido pleural; 12 (2.0%) de orina; y las 38 restantes de diferentes sitios.

De acuerdo al servicio la distribución de cepas de SAMR fue diferente en cada hospital; 80.9% de los SAMR en el H-GUA fueron colectados en 8 servicios: Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (18.8%), infectología (13.6%), medicina interna (11.2%), traumatología (9.4%), cirugía general (7.5%), medicina legal (7.2%), nefrología (6.9%) y neurología (6.3%); el 19.1% estuvo distribuido en los 26 servicios restantes. En el H-CMN el 85.4% de los SAMR fueron aislados en dos servicios: UCI (49%) y pediatría (36.4%). De los 21 servicios médicos del H-MON, UCI (22.6%) y medicina interna (40%) presentaron el mayor porcentaje de aislamientos de SAMR (62.6%). En el H-CAR el servicio predominante fue el de cirugía pediátrica (75%).

6.2 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE

Los resultados de identificación bioquímica obtenidos por el sistema Microscan® identificaron a los 588 aislamientos colectados, como *S. aureus* con un rango de confiabilidad en la identificación superior al 90%.

6.3 SUSCEPTIBILIDAD A OXACILINA Y VANCOMICINA POR KIRBY-BAUER

Los resultados de la prueba de Kirby-Bauer mostraron que 586/588 (99.7%) de las cepas de estafilococos fueron resistentes a oxacilina el 0.3% restante presentó una resistencia intermedia y todos fueron sensibles a vancomicina.

6.4 SUSCEPTIBILIDAD A VANCOMICINA POR MICRODILUCIÓN EN PLACA

Los resultados de las 93 cepas del HGUA (28%) que fueron analizadas por microdilución en placa con sal de vancomicina, mostraron valores cercanos a la resistencia (concentración mínima inhibitoria CMI de 1 a 4 $\mu\text{g/ml}$), aún cuando se mantuvo el fenotipo de sensibilidad, el 69.8% (n=65) presentaron una CMI de 2 $\mu\text{g/ml}$, 27.9% (n=26) tuvieron una CMI de 4 $\mu\text{g/ml}$ y solo dos cepas (2.1%) mostraron una CMI de 1 $\mu\text{g/ml}$.

6.5 SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR MICRODILUCIÓN EN PLACA (MICROSCAN®)

El 100% de los aislamientos de SAMR de los cuatro hospitales mostraron resistencia a penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefotaxima, cefalotina, cefazolina, oxacilina e imipenen. El 86% (n= 506) fueron resistentes a clindamicina, eritromicina y

claritromicina; dentro de ese porcentaje 11 cepas mostraron una susceptibilidad disminuida; el 84% de las cepas (n=495) presentaron resistencia a ciprofloxacina. El 18.7% de los 110 aislamientos presentaron resistencia a gentamicina y solo dos a tetraciclina (0.3%). Todas las cepas de SAMR fueron sensibles a rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol y vancomicina (Fig. 6).

6.6 ANÁLISIS DE PATRONES DE PFGE

El análisis por PFGE permitió agrupar las 588 cepas de SAMR dentro de cuatro tipos clonales M (5 subtipos), A (5 subtipos), B (3 subtipos) y C (26 subtipos), (Cuadro.3, Fig. 7).

H-CMN: Todos los aislamientos (n=75) de SAMR colectados del H-CMN entre 1997 al 2000 pertenecieron a la clona M y subtipos (5 subtipos), En el año 2001 las clonas M (n=7/18) y C (n=11/18) representaron 39 y 61% de los aislamientos, respectivamente y en el año del 2002 la clona M fue totalmente remplazada por la clona C y subtipos (4 subtipos).

H-MON y H-GUA: En estos dos hospitales solo se encontró la presencia de la clona C y sus subtipos. El hospital que mostró el mayor número de subtipos de esta clona fue el H-GUA (20 subtipos), seguido del H-MON con 14 subtipos.

H-CAR: En este hospital se detectaron tres clonas, la clona A n=11, B n=7 presentes en el año 2002, estas dos clonas fueron totalmente remplazadas en el año 2004 por la clona C y sus subtipos (6 subtipos) (n=15). La clona (C) y sus subtipos (26 subtipos) fueron predominantes en los cuatros hospitales estudiados n=488 (83%).

6.7 CORRELACIÓN ENTRE PATRÓN CLONAL Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Las cuatro clonas encontradas en este estudio (M, A, B y C) fueron resistentes a β -lactámicos y multiresistentes, sin embargo, cada una de ellas mostró patrones de resistencia característicos; la clona M fue resistente a gentamicina, la clona A mostró una susceptibilidad disminuida a claritromicina, clindamicina, eritromicina y fue susceptible a ciprofloxacina; mientras que las clonas B y C fueron resistentes a claritromicina, clindamicina, eritromicina y ciprofloxacina; solamente B1 y B2 tuvieron susceptibilidad intermedia a oxacilina e imipenen; los aislamientos del H-CMN pertenecientes a la clona C también presentaron resistencia a gentamicina.

6.8 PATRÓN DIGITAL

Cepas representativas de cada grupo clonal (M, A, B y C) fueron comparadas con cepas prototipo de clonas de SAMR previamente caracterizadas y representativas de las clonas pandémicas internacionales: Pediátrica, Nueva York- Japón, Ibérica, Brasileña y EMRSA-16 (Fig. 7). Los resultados mostraron que la clona C tuvo un coeficiente de similitud del 85.5% con la clona pediátrica (HDE288) y un 89.5% con la clona Nueva

York-Japón (BK2464). Las clonas M, A y B presentaron una elevada similitud con la clona EMRSA-16 (80%) (Fig. 8).

6.9 PATRONES DE HIBRIDACIÓN DEL GEN *mecA* Y EL TRANSPOSON TN554

Los resultados de hibridación evidenciaron que las cepas pertenecientes a la clona M y A presentaron el gen *mecA* contenido en un fragmento de 180 Kb, mientras que las clonas B y C lo presentaron en un fragmento de 211 Kb (Fig. 9). Entre los aislamientos de la clona A una copia de Tn554 fue identificada en el mismo fragmento de *mecA* (~180 Kb); las clonas B y C usualmente tuvieron dos copias del transposón entre los fragmentos de 640 a 211 Kb; la clona M no presentó homología con el transposón Tn554 (Fig. 10 carril 3). Dos cepas colectadas en el H-CAR (4H-CAR, B1 y 15 H-CAR, B2) no hibridaron con la sonda de *mecA*. La única diferencia fue identificada en el fragmento *Sma I* que contiene el gen *mecA*, indicando una deleción que pudo haber incluido al gen *mecA* (Fig. 11).

6.10 PATRÓN DEL CASETE CROMOSOMAL SCC*mec*, PATRÓN *spa* Y MLST

Todas las cepas de SAMR correspondientes a las clonas M y A presentaron el casete SCC*mec* tipo IV; en cambio las clonas B y C presentaron el casete SCC*mec* tipo II, excepto B1 y B2 los cuales no amplificaron el producto esperado (Fig.12) Las cepas representativas de la clona M y A mostraron un patrón *spa* tipo 183: WGKAKAOKMQ y una secuencia tipo (ST30). La clona B presentó tres patrones *spa*: tipo 204:

WGKAKAOMQQQQ presente en las cepas con perfil B y tipo 275: WGKAQQQ, presente en el subtipo B3; ambos grupos de *spa* tuvieron secuencia tipo (ST36). Las cepas con el patrón B1 y B2 presentaron una secuencia tipo (ST30) y un *spa* tipo 33: WGKAKAOMQQ. Los aislamientos representativos de la clona C mostraron un *spa* tipo 2: TJMBMDMGMK y una secuencia tipo 5 (ST5) Cuadro 3.

7. DISCUSIÓN

Staphylococcus aureus ha sido reconocido como uno de los principales patógenos humanos y uno de los microorganismos más importantes causantes de infecciones nosocomiales. *S. aureus* tiene un amplio poder adaptativo a diversos antibióticos y a lo largo del tiempo ha ido adquiriendo resistencia a todos los antibióticos disponibles. El surgimiento de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y otros antimicrobianos constituye un problema importante de salud pública, especialmente en el medio hospitalario, debido a la alta mortalidad causada por infecciones sistémicas asociadas a este grupo de bacterias, el tratamiento adecuado y oportuno de las infecciones causadas por este microorganismo, tendrá un impacto importante en los índices de salud. (92).

Estudios previos evidencian la existencia de un grupo reducido de clonas que se distribuyen en todo el mundo; siete clonas pandémicas principales de SAMR han sido identificadas como las causantes de la mayoría de las infecciones adquiridas en los hospitales en todo el mundo, la clona Brasileña, Húngara, Ibérica, Nueva-York-Japón, pediátrica, EMRSA-16 y EMRSA-15, indicando que estas representan clonas exitosas en términos de su habilidad para causar infecciones, persistir y expandirse de un área geográfica a otra, inclusive traspasar continentes (93).

La combinación de diferentes métodos de tipificación molecular usados en el presente estudio permitió documentar características epidemiológicas relevantes de poblaciones

de SAMR en cuatro diferentes hospitales de la República Mexicana y documentar la coexistencia de clonas de SAMR de distribución internacional.

El estudio mostró que la mayoría de las cepas de SAMR fueron aisladas principalmente de ocho de los 31 servicios que se identificaron en los cuatro hospitales incluidos en el estudio (Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), infectología, medicina interna, traumatología, cirugía general, medicina legal, nefrología y neurología). Diversos estudios han documentado que las unidades de cuidados intensivos son las áreas de más alto riesgo para el surgimiento y diseminación de bacterias multiresistentes, entre ellas de manera importante los SAMR (94,95). Los resultados obtenidos en este estudio confirman lo anterior ya que el 52% de las cepas estudiadas que mostraron los patrones de cepas epidémicas fueron aisladas de las UCI.

El estudio de susceptibilidad mostró que las 588 cepas de SAMR fueron resistentes a, cefotaxima, amoxicilina, cefalotina, cefazolina, imipenem, penicilina y oxacilina. A pesar de que se observó un incremento de la CMI a vancomicina (1 a 4µg/µl) en los aislamientos del H-GUA, no se detectaron cepas de SAMR vancomicina-resistentes. Reportes recientes de SAMR con susceptibilidad disminuida a vancomicina indican que se está poniendo en riesgo la posibilidad de tratar infecciones causadas por *S. aureus* intrahospitalarios debido a que la vancomicina es el antibiótico último de elección en infecciones severas causadas por esta bacteria (32, 34, 35). A finales de 1997 se reportó en Japón la primera cepa SAMR resistente a vancomicina (33).

Como respuesta al surgimiento y diseminación mundial de cepas de *S. aureus* multiresistentes, se hace urgente la creación de sistemas de vigilancia internacional, con metodologías que puedan ayudar a la prevención y control de estos microorganismos. Los datos obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la presencia de clonas de SAMR específicas y de amplia diseminación geográfica en México (76, 47, 96), similar a lo que se ha demostrado para otras clonas en América de Sur, Europa y Estados Unidos (97).

El estudio de las cepas de SAMR mostró que en los diferentes hospitales solo cuatro patrones de PFGE fueron observados (M, A, B y C). Los grupos clonales fueron fácilmente distinguidos por antibiograma, así como por otras características moleculares (SCC*mec*, hibridación *mecA*, hibridación Tn554, patrón *spa* y secuencia tipo por MLST (Cuadro 3). Estudios previos en diferentes partes del mundo refieren que las clonas de SAMR pueden dispersarse entre hospitales, ciudades y continentes y que la distribución intercontinental de estas clonas puede ocurrir (73, 98, 78). Los resultados obtenidos en el estudio sugieren que en nuestro país se han diseminado en diferentes hospitales las clonas de SAMR ya mencionadas.

La clona M presente en el Hospital de Pediatría del CMN, previamente designada como la clona Mexicana (76), fue identificada también en un hospital de Patras, Grecia y estuvo relacionada con la clona EMRSA-16 (99). A pesar de que las clonas M y EMRSA-16 mostraron un patrón de PFGE muy similar (una banda de diferencia), éstas presentaron distintas secuencias tipo (ST30 y ST36, respectivamente) y tipos de casetes

SCC*mec* IV y II respectivamente, lo cual explica en parte la multiresistencia de la clona EMRSA-16 debido a que el casete tipo II porta más determinantes de resistencia Fig.1. A pesar de que la clona M fue exclusiva de los aislamientos del H-CMN y estuvo presente por un período de tiempo largo (1997-2001), hasta el momento esta clona no ha sido reportada en otros países de América Latina, donde se ha observado la presencia de otras clonas: la clona de Brasil (XI:B:B) diseminada en Brasil, Argentina, Chile y Uruguay y la clona chilena II:ZZ:F identificada solo en Chile (76). La clona M fue remplazada por la clona C en el 2002, esto fue debido muy probablemente a las medidas de control y prevención tomadas en el hospital, en las que se incluyeron cambios en el esquema de tratamiento y reforzamiento de las prácticas médicas. Interesantemente la clona A presente en el H-CAR mostró características similares a las de la clona M (SCC*mec* IV, ST30 y *spa* tipo183), solo una banda de diferencia se observó en el patrón de PFGE y el resultado de hibridación para Tn554 solo fue positivo para la clona A, lo cuál explica su resistencia a macrólidos, en comparación con los aislamientos pertenecientes a la clona M, los cuales fueron sensible a este grupo de antibióticos. La clona ST30-IV ha sido previamente reportada en cepas de SAMR en Suiza, Alemania, España y Argentina (100, 90). Las cepas pertenecientes a la clona B presentaron tres tipos *spa*: 204, 275 y 33 diferenciándose entre ellos por la ausencia de 1 a 4 motivos *spa* (KAOM, Q o QQ), siendo común entre los tres, las regiones WGKA al inicio de la secuencia y QQ al final de la misma. Las cepas con los tipo *spa* 204 y 275 presentaron una secuencia tipo (ST36) SCC*mec* II, similar a lo encontrado en la clona internacional EMSA16, la cuál solo varía en un solo locus del ST30: ST36 tiene el alelo 2 *pta*, mientras que ST30 posee el alelo 6 (100). El tipo *spa*: 33 WGKAKAOMQQ presente

solo en los aislamientos B1 y B2 (*mecA*), ya había sido encontrado en cepas esporádicas de SAMR aisladas en 1995 en Argentina, pero interesantemente esas cepas fueron *mecA* positivo, pero no tuvieron homología con *Tn554* (101).

La clona designada como C fue identificada en los cuatro hospitales estudiados, esta clona representó mas del 80% de los SAMR que fueron recobrados de diversas fuentes infecciosas y servicios hospitalarios. Con base en nuestros resultados, se observó que esta clona ha estado circulando en el H-GUA desde el año de 1999; en el H-CMN y H-MON desde el año 2001 y en el H-CAR se detectó a partir del año 2002. Los resultados obtenidos por medio de las diferentes técnicas moleculares, mostraron que la clona C presentó un patrón *spa* tipo 2 TJMBMDMGMK, una secuencia tipo (ST 5) y un patrón *SCCmec* tipo II. La combinación de características sugiere fuertemente que la clona C reportada en este estudio es muy similar (89.5%) a la clona multiresistente Nueva York-Japón (Fig. 8), linaje clonal que se encuentra ampliamente diseminado en diferentes partes de los Estados Unidos (71,81,102,103). Probablemente esta clona pudo haber sido transferida de Estados Unidos a México, como ya se ha identificado en otros casos de diseminación de clonas entre países y continentes (93). Esta diseminación probablemente se vio favorecida principalmente por el desplazamiento continuo de viajeros.

El mayor número de subtipos de la clona C se identificaron en el H-GUA y en el H-MON, 20 y 14 subtipos respectivamente; los subtipos C3, C2, C14 y C4 fueron los más abundantes e interesantemente estos estuvieron presentes en los cuatro hospitales;

probablemente el gran número de subtipos de PFGE indican la continua divergencia evolutiva de esta clona durante su expansión geográfica masiva. La substitución de una clona moderadamente resistente (clona M) por una clona de mayor resistencia (clona C) puede crear serios problemas de morbi-mortalidad y por consiguiente de salud pública debido a que las opciones terapéuticas son más limitadas. Se ha documentado que siete de las ocho cepas de *S. aureus* vancomicina- intermedio, reportadas en los Estados Unidos y los primeros dos aislamientos de *S. aureus* con resistencia elevada a vancomicina, (el primero de ellos con una CMI de 1024 µg/ml), los cuales adquirieron el transposón Tn1546 de *Enterococcus faecalis*, son descendientes de la clona Nueva York-Japón (34, 35, 103, 104). El hecho de que cepas descendientes de esta clona se encuentren circulando en estos hospitales, aunado a la poca restricción de antibióticos que existe, debido a la prescripción innecesaria de fármacos de ultima elección y a la no utilización de antibióticos de primera línea puede potenciar el surgimiento de cepas de *S. aureus* vacomicina-resistentes en México, situación que se reporta cada día más en diversas partes del mundo (105, 106)

Las clonas A y B fueron sólo localizadas en aislamientos del H-CAR en el año 2002, estas clonas mostraron un alto grado de similitud con la clona EMRSA-16, este patrón es uno de los tipos dominantes de SAMR identificados en hospitales del Reino Unido (107) y se encuentra ampliamente diseminado en Canadá (108) y Grecia (99). Interesantemente, ambas clonas (A y B) son muy similares (90% de homología) (Fig. 7 y 8), sin embargo, la clona A mostró un perfil de resistencia más reducido que la clona

B, esto es debido a la existencia del patrón SCC*mec* IV y la secuencia tipo ST30 presente en estos aislamientos (Fig. 12, Cuadro 3); este casete cromosomal se ha relacionado con cepas de SAMR aisladas en la comunidad (CA-MRSA) (47,109); recientemente fue publicado el primer reporte de CA-MRSA causante de diversas infecciones en Brasil (110).

Una inestabilidad genética del elemento *mec* fue observada en dos cepas y esto estuvo asociado con una aparente delección del elemento *mec* (Fig. 11 y 12), estos aislamientos presentaron patrones muy similares al perfil de PFGE B (B1 y B2), con una susceptibilidad disminuida a oxacilina, estas dos cepas presentaron una secuencia tipo ST30. En la literatura existen reportes de cepas de *S. aureus* con niveles reducidos de resistencia a meticilina (CMI 2-4 µg/ml) que no están asociados con la presencia del gen *mecA*. Tomasz y cols. (111) reportaron una clase de cepas de *S. aureus* moderadamente resistentes que presentaron dos proteínas de unión a la penicilina (PBP1 y PBP2) con una afinidad de unión alterada y una sobre producción de la PBP4. Otra clase de susceptibilidad disminuida a meticilina fue atribuida a una sobre producción de penicilinas (112). Hackbarth y cols. analizaron la secuencia nucleotídica del gen de la PBP2 en cepas meticilino-resistentes que no portan el gen *mecA* e identificaron una mutación puntual (A-576-S) cerca del dominio de unión a la penicilina (113). Recientemente fue reportada una cepa de SAMR (*mecA*⁻) con resistencia elevada a meticilina (CMI 64µg/ml), se observó que esta cepa presentó una pared celular engrosada y rugosa en comparación con el control sensibles y se encontró que produce tres veces más PBP2.(114).

La combinación de métodos de tipificación molecular (PFGE, hibridación del gen *mecA* y el transposón Tn554, el casete SCC*mec*, el patrón *spa* y la secuencia tipo por MLST) aunado a la información clínica y epidemiológica permite la detección de grupos y brotes de SAMR. Nuestro estudio enfatiza la necesidad de colaboraciones internacionales para monitorear la diseminación de cepas epidémicas, así como el surgimiento de nuevas clonas en nuestra población. Los mecanismos de diseminación son pobremente entendidos y estudios futuros son necesarios para comprender la dinámica involucrada en la predominancia de clonas únicas de SAMR.

El esclarecimiento de los factores que contribuyen a la superioridad epidémica de las clonas de SAMR pandémicas, los altos niveles de expresión de ciertos genes de virulencia y la habilidad para sobrevivir en el medio ambiente, pueden ser factores de gran importancia para el control y erradicación de los SAMR que circulan actualmente en el mundo.

8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1. Un número reducido de hospitales estudiados
2. Pérdida de cepas a lo largo del periodo de estudio
3. Falta de análisis por MLST de todos los subtipos de la clona C
4. Desconocimiento de la población total de *S. aureus* en los hospitales estudiados, lo que impide hacer una estimación de la prevalencia.

9. PERSPECTIVAS

1. Mantener la vigilancia epidemiológica de los SAMR en los hospitales mexicanos con la finalidad de monitorear el comportamiento de las diferentes clonas.
2. Incluir un mayor número de hospitales o instituciones del sector salud, para generar información epidemiológica y molecular sobre SAMR que sea representativa a nivel nacional.
3. Realizar estudios que involucren la toma de muestra de portadores, con la finalidad de detectar las posibles rutas de transmisión de las clonas de SAMR y los reservorios a partir de los cuales se disemina este microorganismo.
4. Realizar estudios encaminados a identificar los factores de virulencia presentes en las clona de SAMR identificadas.
5. Generar estudios para la detección de clonas de SAMR causantes de infecciones en la comunidad, ya que en la actualidad representa un problema de salud pública importante.
6. Difundir la información generada a los tomadores de decisiones en salud.

10. REFERENCIAS

1. **Kloss, W.** Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. *In the Staphylococci in human disease*, pp 113-215. 1997. Edited by K.B. Crossley & G.L. Archer. New York Churchill Livingstone.
2. **Wieneke, A. A., Roberts, D. and Gilbert, R. J.** Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom. *Epidemiol Infect.* 1993; **110**: 1969-1990.
3. **Low, D. E.** Clinical microbiology: issues in identification and susceptibility testing. *In the Staphylococci in human disease*. 1997. pp 233-252. Edited by K. B. Crossley & G. L. Archer. New York Churchill Livingstone.
4. **Crossley, K. B. and Archer, G.L.** The staphylococci in human disease. 1997. New York Churchill Livingstone.
5. **Lowy, F. D.** *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 1998; **339**: 520-532.
6. **Monday, S. R., and Bohach, G. A.** Properties of *Staphylococcus aureus* enterotoxins and toxins shock syndrome toxin-1. 1999. p. 589-610. *In* J. E. Alouf and J. H. Freer (ed.), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 2nd ed. Academic Press, London, England.
7. **Projan, S. J. and Novick, R. P.** The molecular basis of pathogenicity. *In the Staphylococci in human disease*. 1997. pp 55-81. Edited by K. B. Crossley & G. L. Archer. New York Churchill Livingstone.

8. **Jerraud, S., Peyrat, M. A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandennesch, F., and Lina, G.** *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2001; **166**:669-77.
9. **Orwin, P. M., Leung, D.Y., Donahue, H.L., Novick, R.P., and Schlievert, P.M.** Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun.* 2001; **69**:360-6.
10. **Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Amagai, M., and Sugai, M.** Identification of the *Staphylococcus aureus etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect Immun.* 2002; **10**:5835-5845.
11. **Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., and Vandenesch, F.** Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002; **70**:631-41.
12. **Cheung, A.L., Koomey, J.M., Butler, C.A., Projan, S.J. and Fischetti, V.A.** Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; **89**: 6462-6466.
13. **Tenover, F. C., and Gaynes, R. P.** The epidemiology of *Staphylococcus* infections. 2000. p. 414-421. *In* V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), Gram-positive pathogens. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

14. **Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N. and Wenzel, R.P.** Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* 1999; **29**: 239-244.
15. **Boyce, J.M.** Epidemiology and prevention of nosocomial infections. *In the Staphylococci in human disease.* 1997. pp 309-329. Edited by K. B. Crossley & G. L. Archer. New York Churchill Livingstone.
16. **Selvey, L.A., Whitby, M., Johnson, B.** Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: is it any worse than nosocomial methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; **21**:645-648.
17. **Diaz, R.D., Solórzano, S.F., Padilla, B.G., Miranda, N.G., González, R.R., Trejo, P.A.** Infecciones Nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Salud Publica Mex* 1999; **41**: 12-17.
18. **Chávez, P.B.** Infecciones intrahospitalarias ¿Que ha pasado durante 23 años? *Enf Infec Micro* 2004; **24**:89-92.
19. **Molina, G.J., Garza, M.H.** Vigilancia de infecciones nosocomiales en un hospital de cardiología. *Salud Publica Mex* 1999; **41**:26-31.
20. **Ponce de León, S., Rancel, F.S., Elias, L.J., Romero, O.C., Huertas, J.M.** Infecciones nosocomiales: tendencias seculares de un programa de control en México. *Salud Publica Mex* 1998; **41**:5-11.
21. **Vargas, O.R., Salgado, C.J.** Agentes causales de neumonía nosocomial y su relación con microorganismos del ambiente hospitalario en pacientes de la unidad de cuidados intensivos. *Enf Infec Micro* 2004; **24**:60-63.

22. **Camacho, R.R., Avila, R.R., López, G.E., Rodríguez de la Garza, R., Sánchez, Z.M., Masud, Y.Z.J.** Epidemiología de las infecciones nosocomiales en una unidad de terapia intensiva Pediátrica. *Enf Infec Micro* 2004; **24**:55-59.
23. **Boyce, J.M.** MRSA patients: proven methods to treat colonization and infections. *J. Hosp. Infect.* 2001; **48 Suppl A** S9-14.
24. **Wenzel, R.P., Nettleman, M.D., Jones, R.N. and Pfaller, M.A.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990s and effective control measures. *Am. J. Med.* 1991; **91**: 221S-227S.
25. **Jensen, A.G., Wachmann, C.H., Poulsen, K.B., Esperse, F., Scheibel, J., Skinhoj, P. and Frimodt-Moller, N.** Risk factor for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch. Intern. Med.* 1999; **159**: 1437-1444.
26. **Voss, A. and Kluytmans, J.A.** Models for hospital infection control: a view from the Netherlands. *Clin. Microbiol. Infect.* 2000; **6**: 410-412.
27. **Eggimann, P. and Pittet, D.** Nonantibiotic measures for the prevention of Gram-positive infections. *Clin. Microbiol. Infect* 2001 **7 Suppl 4**: 91-99.
28. **Speller, D.C., Johnson, A.P., James, D.** Resistance to methicillin and others antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-1995. 1997; *Lancet* **250**: 323-325.
29. **Jessen, O., Rosendal, K., Buloww, P.** Changing sthaphylococci and staphylococcal infections: a ten year study of bacteria and cases of bacteremia. *N. Engl. J. Med.* 1999; **281**: 627-635.

30. **Panlilio, A.L., Culver, D.H., Gaynes, R.P.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975-1991. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1992; **13**: 582-586.
31. **Stefani, S. and Varaldo, P.E.** Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin Microbiol. and Infect.* 2003; **9**:1179-1186.
32. **Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ito, K.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; **40**: 135-136.
33. **Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H.** Disseminations in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 1997; **350**:1670-1673.
34. **Centers for Disease Control.** Public health dispatch: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Pennsylvania, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep.* **51**:902-903.
35. **Centers for Disease Control.** *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin, United States, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep.* **51**:565-567.
36. **Macia, H., Medina, V., Gaona, R.** Estafilococos resistentes a meticilina en un hospital general de León Guanajuato. *Enferm. Infect. Microbiol.* 1993; **3**:123-127.
37. **Solano, L.I., Urdez, H.E., Fajardo, V.R.** Infecciones Intrahospitalarias (IIH) causadas por estafilococos resistentes a meticilina (EMR). *Enf. Infec. Microl.* XXIV Congreso Annual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. 1999; **19**: S38.

- 38. Calderón, J.E., Espinoza, M.L.E., Avila, B.R.** Epidemiology of drug resistance: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci infections. *Salud Pública Méx* 2002; **44**:108-12.
- 39. Archer, G.L., Niemeyer, D.M.** Origen and evolution of DNA asociated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol.* 1994. **2**:343-347.
- 40. Pinho, M.G., de Lencastre, H. and Tomasz A.** An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc. Nalt Acad Sci USA.* 2001; **98**: 10886-91.
- 41. Pinho, M.G., Filipe, S.R., de Lencastre, H. and Tomasz A.** Complementation of essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2001; **183**: 6525-6531.
- 42. Song, M.D., Wachi, M., Doi, M., Ishino, F. and Matsubishi, M.** Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett.* 1987; **221**, 167-171.
- 43. Dubin, D.T., Matthews, P.R., Chikramane, S.G. and Stewart, P.R.** Physical mapping of the *mec* region of an American methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Antmicrob. Agents Chemother.* 1991; **35**: 1661-1665.
- 44. Wada, A., Katayama, Y., Hiramatsu, K. and Yokota T.** Southern hybridization analysis of the *mecA* deletion from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; **176**: 1319-1325.

45. Ito, T., Katayama, Y. and Hiramatsu, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; **43**: 1449-1458.
46. Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimota, K., Tiensasitorn, C. and Hiramatsu, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; **45**: 1323-1336.
47. Velazquez M.M.E., Aires de Sousa, M., Echaniz, A.G., Solorzano, S.F., Miranda, N.G, Silva, S.J., de Lencastre, H. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. *J Clin Micro* 2004; **42**:3877-3880.
48. Okuma, K., Iwakawa, K., Turnidge, J.D., Grubb, W.B., Bell, J.M., O'Brien, F.G., Coombs, W.G., Pearman, J.W., Tenover, F.C., Kapi, M., Tiensasitorn, C., Ito, T. and Hiramatsu, K. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J. Clin. Microbiol.* 2002; **40**:4289-4294.
49. Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. and Ito, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2001; **9**: 486-493.
50. Oliveira, D.C., Tomasz, A. and de Lencastre, H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb. Drug Resist.* 2001; **7**: 349-361.

- 51. Couto, I., de Lencastre, H., Severina, E., Kloss, W., Webster, J.A., Hubner, R.J., Sanches, S.I. and Tomasz, A.** Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resist.* 1996; **2**: 377-391.
- 52. Paulsen, I.T., Firth, N. and Skurray, R.A.** Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams. *In the Staphylococci in human disease.* 1997. pp 158-174. Edited by K. B. Crossley & G. L. Archer. New York Churchill Livingstone.
- 53. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**:2233-2239.
- 54. Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith D.H., Waddington, M., Dodge D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S. and Kreiswirth B.N.** Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1999; **37**:3556-63.
- 55. Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., and Spratt, B.G.** Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**:1008-15.
- 56. Arbeit, R.D.** laboratory procedures for epidemiology analysis In the *Staphylococci in human disease.* New York: Churchill Livingstone, 1997: 158-174.
- 57. Weller, T.M.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be international standard? *J Hosp Infect* 2000; **44**:160-172.

- 58. Musser, J.M., Schliever, P.M., Chow, A.W., Ewan, P., Selander, R.K.** A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 1990; **87**: 225-229.
- 59. Kreiswirth, B.J., Kornblum, R.D., Arbeit, W., Eisner, J.N., Maslow, A., McGeer D.E., Novick, R.P.** Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science 1993; **259**:227-230.
- 60. de Lencastre, H., Couto, I., Santos, I., Melo, C.J., Torres, P.A., Tomasz, A.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; **13**:64-73.
- 61. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., et al.** Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1994; **32**: 407-415.
- 62. Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers I.M., Achtman, M. and Spratt B.G.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 1998; **95**:3140-3145.
- 63. Spratt, B.G.** Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. Curr Opin Microbiol 1999; **2**:312-316.

64. Tomasz, A. de Lencastre, H. Molecular microbiology and epidemiology: coexistence or alliance? In prevention and control of nosocomial infections. Baltimore: Williams and Willkins, 1997:309-321.
65. Domínguez, M.A., de Lencastre, H., Liñares, J., Tomasz, A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in and Spanish hospital. J Clin Microbiol 1994; **32**:2081-2087.
66. Sanches, I., Ramirez, M., Troni, H., Abecassis, M., Pádua, M., Tomasz, A., de Lencastre, H. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone between Portugal and Spain. J Clin Microbiol 1995; **33**:1243-1246.
67. Mato, R., Santos, I., Venditti, M., Platt, D.J., Brown, A., Chung, M., de Lencastre, H. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. Microb Drug Resist 1998; **4**:107-112.
68. Witte, W., Kresken, M., Braulke, C., Cuny, C. Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospital. Clin Microb Infect 1997; **3**:414-422.
69. Deplano, A., Witte, W., va Leeuwen, W.J., Brun, Y., Struelens, M.J. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. Clin Microb Infect 2000; **6**:239-245.

70. Melter, O., Aires de Sousa, M., Urbášková, P., Jakubů, V., Žemličková, H., de Lencastre, H. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. J Clin Microb 2003; **41**:4998-5005.
71. Roberts, R.B., de Lencastre, A., Eisner, W., Severina, E.P., Shopsin, B., Kreiwith, B.N., Tomasz, A. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. J Infect Dis 1998; **178**:164-171.
72. Teixeira, L., Resende, C.A., Ormonde, L.R., Rosenbaum, R., Figueiredo, A., de Lencastre, H., Tomasz, A. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. J Clin Microbiol 1995; **33**:2400-2404.
73. Aires de Sousa, M., Sanches, I., Ferro, M.L., Vaz M.J., Saraiva, Z., Tendeiro, T.Serra, J., de Lencastre H. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *staphylococcus aureus* clone. J Clin Microbiol 1998; **36**:2590-2596.
74. Oliveira, D., Sanches, S.I., Tamayo, M., Ribeiro, G., Mato, R., Costa, D., de Lencastre, H. Virtually all MRSA infections in the largest Portuguese hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: the "Iberian" and "Brazilian" clones of MRSA. Clin Microbiol Infect 1998; **4**:373-384.
75. Corso, A., Santos, S.I., Aires de Sousa, M., Rossi, A., de Lencastre, H. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. Microb Drug Resist 1998; **4**:277-288.
76. Aires de Sousa, M., Miragaia, M., Santos, I., Avila, S., Adamson, I., Casagrande, S. Brandileone, C., Palacio, R., Dell'acqua, L., Hortal, M., Camou, T., Rossi, A., Velazquez, ME., Echaniz, G., Solorzano, F., Heitmann, I. de

- Lencastre, H.** Three year Assesment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. J Clin Microbiol 2001; **39**:2197-2205.
77. **Melter, O., Santos, S. I., Schindler, J., Aires de Sousa, M., Mato, R., Kovarova, V., Zemlickova H., de Lencastre H.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. J Clin Microbiol 1999; **37**:2798-2803.
78. **de Lencastre, H., Severina, E.P., Milch, H., Thege, M.K., Tomasz, A.** Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian Hospitals. Clin Microbiol Infect 1997; **3**:289-296.
79. **Oliveira, D.C., Crisóstomo, I., Santos, S.I., Major, P., Alves, C.R., Aires de Sosa, M., Thege M.K. and de Lencastre H.** Comparison of DNA sequencing of the protein A gene polymorphic region with other molecular typing techniques for typing two epidemiologically diverse collections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2001; **39**:574-580.
80. **Aires de Sousa, M., Crisóstomo, I., Santos, S.I., Wu, J.S., Fuzhong, J., Tomasz, A., de Lencastre, H.** Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. J. Clin Microbiol 2003; **41**:159-163.
81. **Roberst, R.B., Chung, M., de Lencastre, H., Hargrave, J., Tomasz, A., Nicolau, D.P., John, J.F., Korzeniowski, O.** Distribution of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey and Pennsylvania. Microb Drug Resist 2000; **6**:245-251.
82. **Aires de Sousa, M., de Lencastre, H., Santos, S.I., Kikuchi, K., Totsuka, K., Tomasz, A.** Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing

properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. *Microb Drug Resist* 2000; **6**:253-258.

- 83. Sá-Leão, R., Santos, S.I., Dias, D., Peres, I., Barros, R.M., de Lencastre, H.** Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and international samples: relics of a formerly widely disseminated strains? *J Clin Microbiol* 1999; **37**:1913-1920.
- 84. Leski, T., Oliveira, D., Trzcinski, K., Sanches, I., Aires de Sousa, M., Hryniewicz, W., de Lencastre, H.** Clonal Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. *J Clin Microbiol* 1998; **36**:3532-3539.
- 85. Gomes, A.R., Sanches, I., Aires de Sousa, M., Castaneda, E., de Lencastre H.** Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microb Drug Resist* 2001; **7**:23-32.
- 86. Crisóstomo, M.I., Westh, H., Tomasz, A., Chung, M., Oliveira, D.C., de Lencastre H.** The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001; **98**:9865-9870.
- 87. de Lencastre, H., Chung, M., Westh, H.** Archaic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* molecular and microbiological properties of isolates from the 1960s in Denmark. *Microb Drug Resist* 2000; **6**:1-10.

- 88. National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement: vol. 21, no. 1. Approved Standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, Pa.2004.
- 89. Matthews, P.R., Reed, K.C., and Stewart, P.R.** The cloning of chromosomal DNA associated with methicillin and other resistances in *Staphylococcus aureus*. J. Gen Microbiol 1987; **133**: 1919-1929.
- 90. Oliveira, D. C., and de Lencastre, H.** Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 2002; **46**:2155-61.
- 91. Struelens, M.J., Deplano, A., Godard, C., Maes, N. and Serruys, E.** Epidemiological typing and delineation of genetic relatedness of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by macro-restriction analysis of genomic DNA by using pulsed field electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 1992; **30**: 2599-2605.
- 92. Cosgrove, S.E., Sakoulas, G., Perencevich, E.N., Schwaber, M.J., Karchmer, A.W., and Carmeli, Y.** Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta analysis. Clin. Infect. Dis. 2003; **36**:53-59.
- 93. Oliveira, D. C., Tomasz, A., and de Lencastre, H.** The secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect. Dis. 2002; **2**:181-90.

94. Grundmann, H., Hori, S., Winter, B., Tami, A. and Austin, D.J. Risk factors for the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an adult intensive care unit: fitting a model to the data. J. Infect. Dis. 2002; **185**:481-488.
95. Klevens, R.M., Edwards, J.R., Tenover, F.C., McDonald, L.C., Horan, T., Gaynes, R., National Nosocomial infections surveillance System. Changes in the epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. Clin. Infect. Dis. 2006; **42** 389-391.
96. Echániz, A.G., Velazquez, M.M.E., Aires de Sousa, M., Morfín, O.R., Carnalla, B.N., Esparza, A.S. Molecular characterization of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in a Mexican Hospital. Clin. Microbiol. Infect. 2006; **12**:22-28
97. Da Silva Coimbra, M.V., Silva-Carvalho, M.C., Wisplinghoff, H., Hall, G.O. Tallent, S., Wallace, S., Edmond, M. B., Figueiredo, A.M. and Wenzel, R.P. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. J. Hosp. Infect. 2003; **53**: 103-110.
98. Auken, H.M., Ganner, M., Murchan, S., Cookson B. D. and Johnson, A.P. A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 2002; **50**:171-175.
99. Aires de Sousa, M., Bartzavali, C., Spiliopoulou, I., Santos Sanches, I., Crisostomo, M. I. and de Lencastre, H. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. J. Clin. Microbiol. 2003; **41**:2027-31.

100. **Enright, MC; Robison D.A; Randle G; Field E.J; Grundmann H; Spratt B.G.** The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002; **99**: 7687-7692.
101. **Aires de Sousa M. and H. De Lencastre.** Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. J. Clin. Microbiol. 2003; **41**: 3806-3815.
102. **Chung, M., Dickinson, G., de Lencastre, H. and Tomasz. A.** International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. J Clin Microbiol. 2004; **42**:542-547.
103. **McDougal, L. K., Steward, C. D., Killgore, G. E., Chaitram, J. M., McAllister, S. K. and Tenover, F. C.** Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol. 2003; **41**:5113-5120.
104. **Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R., Clark, N. C., McDougal, L. K., Flannagan, S. E., Kolonay, J. F., Shetty, J., Killgore, G. E. and Tenover, F. C.** Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science. 2003; **302**:1569-1571.
105. **Phongsamart, W., Srifeungfung, S., Tiensasitorn, C., Vanprapar, N., Chearskul, S., Chokephaibulkit, K.** The first pediatric case of *Staphylococcus aureus* with heterogenous resistant to vancomycin endocarditis in Thailand. J. Med. Assoc. Thai. 2005; **88** Suppl 8, S264-S268.

106. **Appelbaum, P.C.** MRSA the tip of the iceberg. *Clin. Microbial. Infect.* 2006; **12**: suppl 2:3-10.
107. **More, P.C., and Lindsay, J.A.** Molecular characterization of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain, EMRSA-15 and EMRSA-16. *J. Med. Microbiol.* 2002; **51**:516-521.
108. **Simor, A.E., Ofner-Agostini, M., Bryce, E., McGeer, A., Paton, S., and Mulvey, M.R.** Laboratory characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals: results of 5 years of national surveillance, 1995-1999. *J. Infect. Dis.* 2002; **186**:652-660.
109. **Qi, W., Ender, M., O'Brien, F., Imhof, A., Ruef, C., McCallun, N., Berger-Bachi, B.** Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): Prevalence of type IV SCCmec and a New SCCmec element associated with isolates of intravenous drug users. *J. Clin. Microbiol.* 2005; **43**: 5164-5170.
110. **Ribeiro, A., Dias, C., Silva-Carvalho, C., Berquó, L., Antunes, F.F., Soares, S.R., Teixeira, F.B., Figueiredo, A.** First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J. Clin. Microbiol.* 2005; **43**:1985-1988.
111. **Tomasz, A., Drugeon, H.B., de Lencastre, F.H., Jabes, D., McDougal, L. and Bille, J.** New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicro. Agents Chemother.* 1989; **33**:1869-1874.

112. **McDougal, L.K., and Thornsberry, C.** The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.* 1986; **23**:832-839.
113. **Hackbarth, C.J., Kocagoz, T., Kocagoz, S., and Chambers, H.F.** Point mutation in *Staphylococcus aureus* PBP2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; **39**:103-106.
114. **Yoshida, R., Kuwahara-Arai, K., Baba, T., Cui, L., Richardson, J. and Hiramatsu, K.** Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin-resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; **51**:247-255.

11. FIGURAS

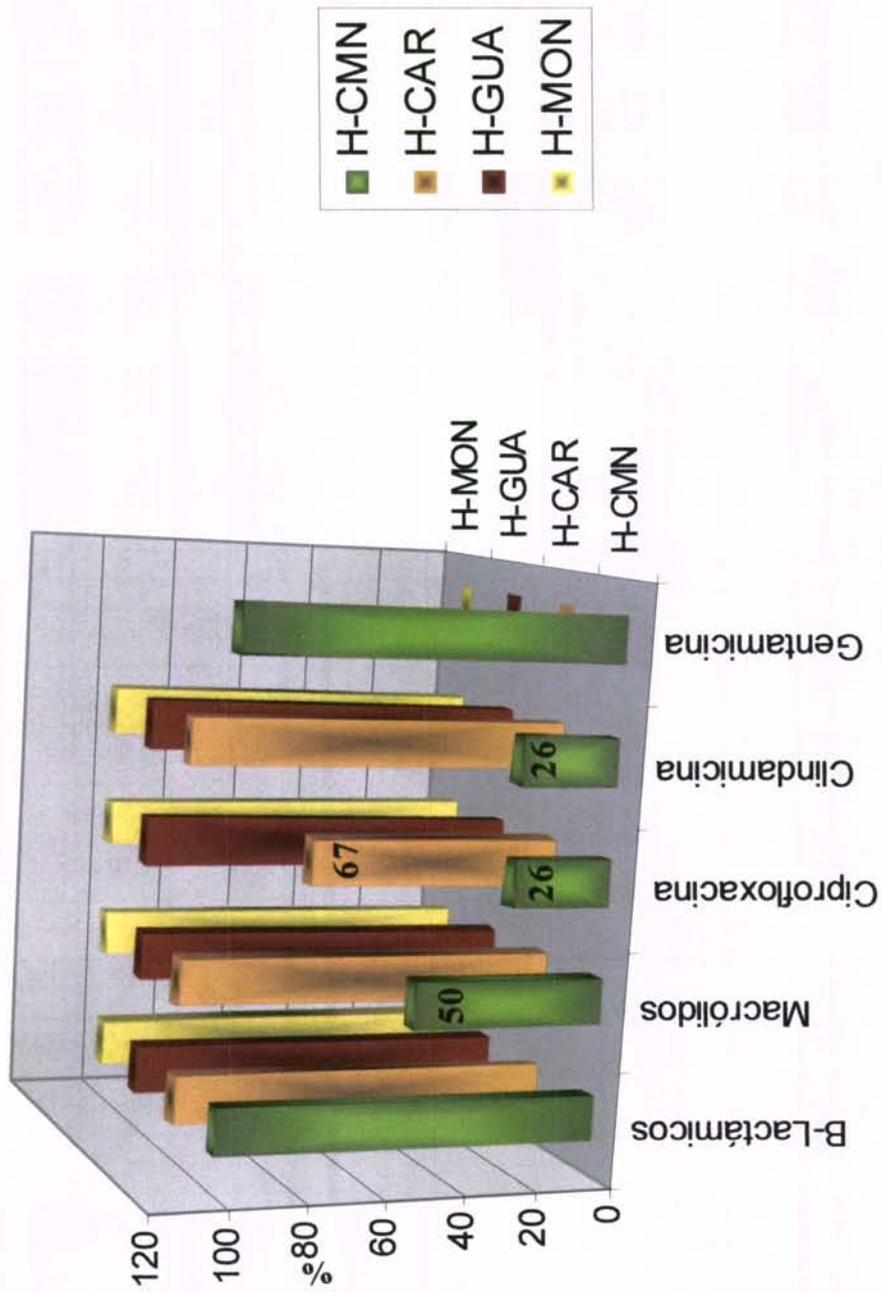


Fig. 6. Porcentajes de resistencia antimicrobiana de las cepas de SAMR aisladas de 1997 al 2004, en el Hospital de Pediatría (H-CMN); Hospital Civil de Guadalajara (H-GUA); Hospital Universitario de Monterrey (H-MON) e Instituto Nacional de Cardiología (H-CAR)

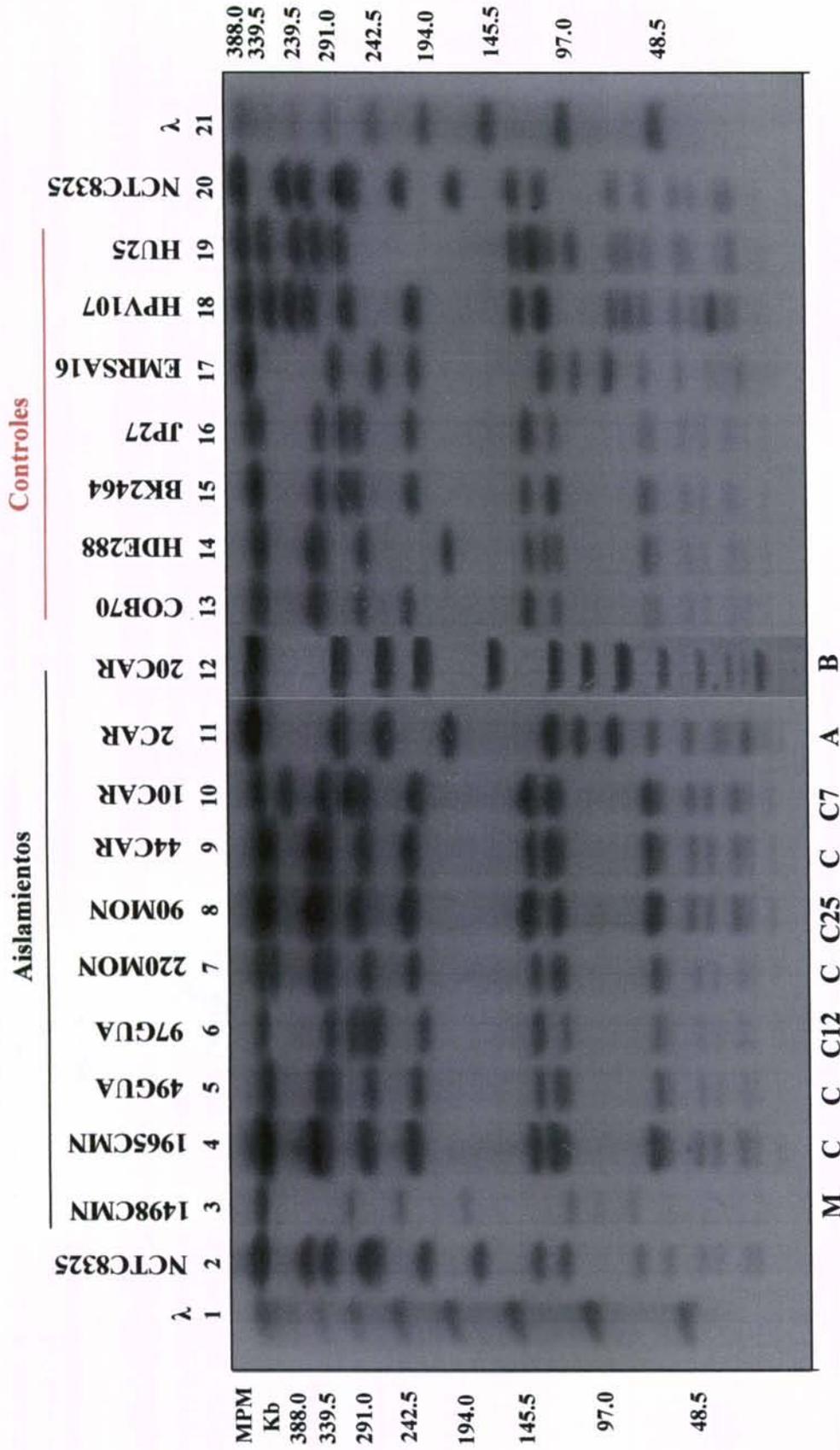


Figura 7. Patrones electroforéticos de campos pulsados de las clones M, C, A y B aisladas de 1997 al 2004. Carril 1 y 21 MPM lambda, líneas 2 y 20 cepa control NCTC8325, carril 3 cepa 1498CMN patrón de PFGE M; carriles 4-10 cepas 1965 CMN, 49GUA, 97GUA, 220MON, 90MON, 44CAR y 10CAR, patrones de PFGE de la clona C y subtipos; línea 11 cepa 2CAR, patrón de PFGE A, carril 12 cepa 20CAR, patrón de PFGE B. Carriles 13-19, cepas controles representativas de clones internacionales COB70 (clona Pediátrica-Colombia); HDE288 (clona Pediátrica-Portugal); BK2464 (clona NY/Japón-USA); JP27 (clona NY/Japón-Japón); EMRSA-16 (clona-Reino Unido EMRSA-16 (clona-Reino Unido); HPV107 (clona Ibérica); HU25 (clona Brasileña).

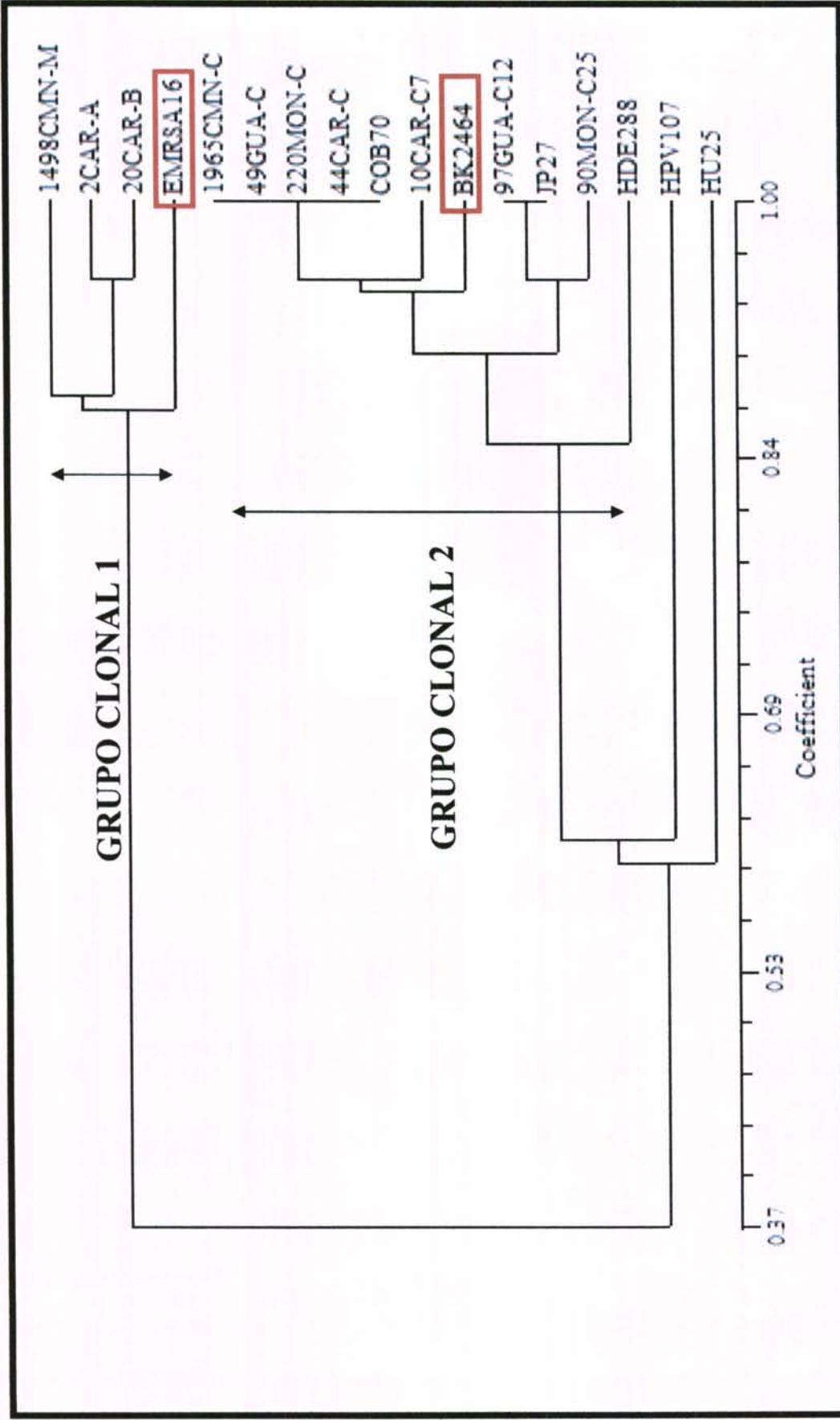


Fig. 8. Dendrograma de similitud de las clonas M, C, A y B utilizando el coeficiente de similitud de Dice. El análisis agrupa las cepas en dos grupos. Grupo clonal 1 cepas 1498CMN, 2CAR y 20CAR, clonas M, A y B respectivamente, relacionadas con la clona internacional **EMRSA-16** (clona-Reino Unido); Grupo clonal 2 cepas 1965CMN, 49GUA, 220MON, 44CAR, 10CAR, 97GUA, 90MON, clona C y subtipos, relacionadas con las clonas internacionales COB70, (clona Pediátrica-Colombia); **BK2464** (clona NY/Japón-USA); JP27 (clona NY/Japón-Japón); HDE288 (clona Pediátrica-Portugal). Las clonas HPV107 (clona Ibérica) y HU25 (clona Brasileña) se encuentran más distantes.

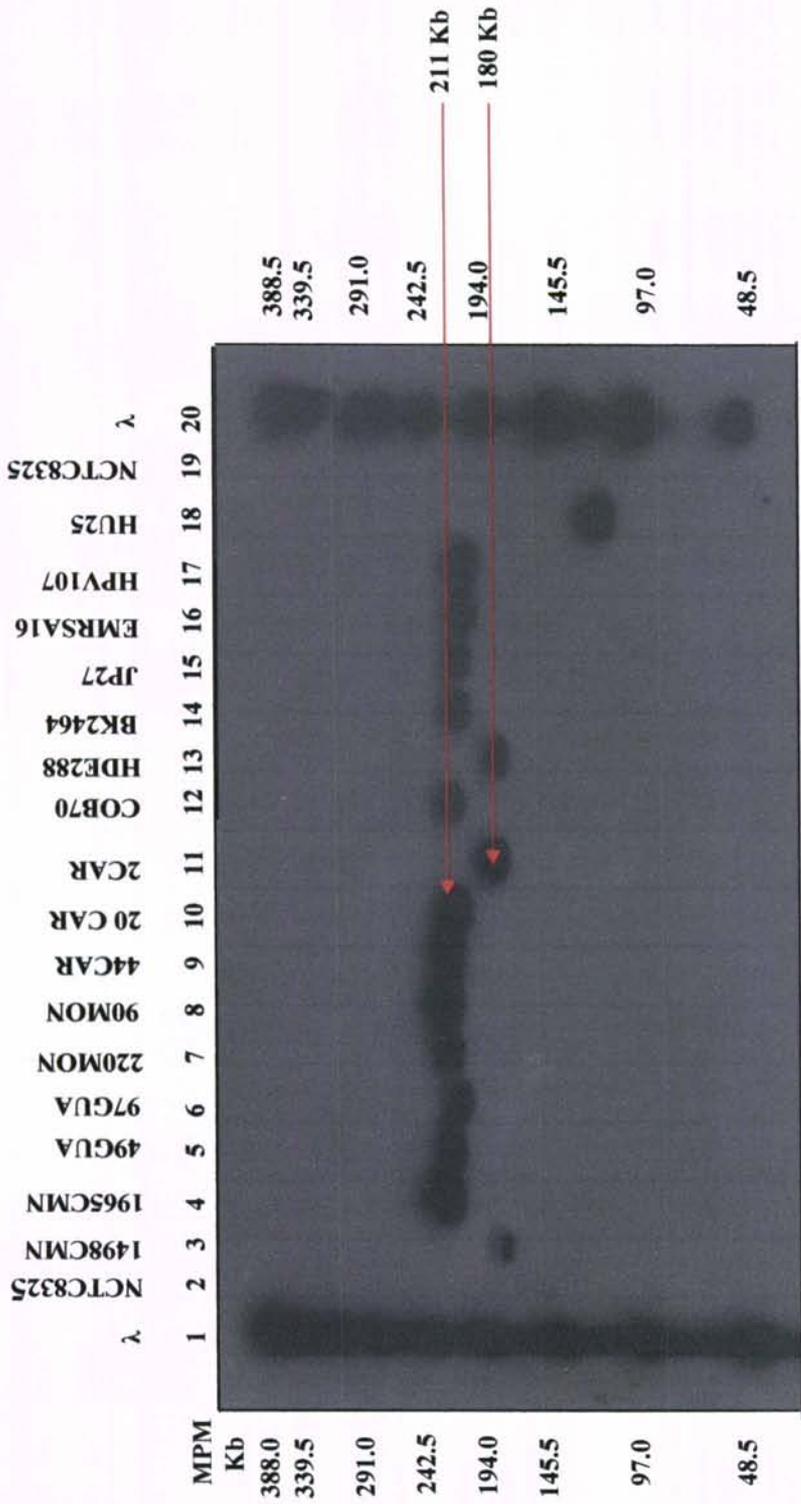


Figura 9. Hibridación del gen *mecA*. Carril 1 y 20 MPM lambda, líneas 2 y 19 cepa control NCTC8325, *mec* negativo, carril 3 cepa 1498CMN, clona M, *mec* (~180 Kb) carriles 4-9 cepas 1965 CMN, 49GUA, 97GUA, 220MON, 90MON y 44CAR, clona C y subtipos, *mec* (~211Kb) línea 10 cepa 20 CAR, clona B, *mec* (~211Kb) carril 11 cepa 2CAR, clona A, *mec* (~180 Kb) . Carriles 12-18, cepas controles representativas de clonas internacionales COB70 (clona Pediátrica-Colombia); HDE288 (clona Pediátrica-Portugal); BK2464 (clona NY/Japón-USA); JP27 (clona NY/Japón-Japón); EMRSA-16 (clona-Reino Unido); HPV107 (clona Ibérica); HU25 (clona Brasileña) mostrando el fragmento de *mec* en pesos de ~120,180 y 211 Kb.

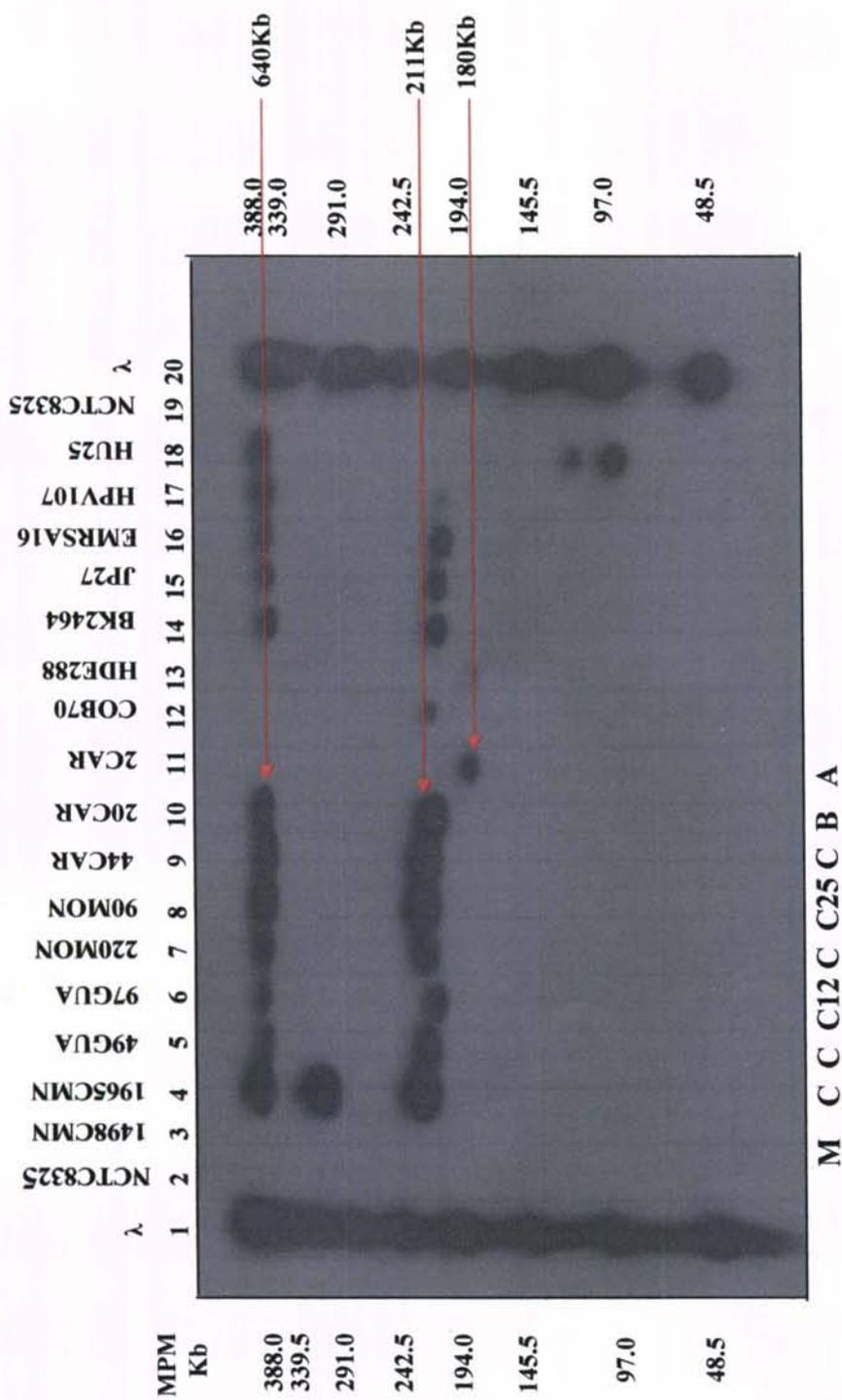


Figura 10. Hibridación del transposón Tn554. Carril 1 y 20 MPM lambda, líneas 2 y 19 cepa control NCTC8325, Tn554 negativo, carril 3 cepa 1498CMN, clona M, no homología con Tn 554, carriles 4-9 cepas 1965 CMN, 49GUA, 97GUA, 220MON, 90MON y 44CAR, clona C y subtipos Tn554, (194-), línea 10 cepa 20 CAR, clona B, Tn554 (~ 211 y 640Kb) carril 11 cepa 2CAR, clona A, Tn554 (~180 Kb) . Carriles 12-18, cepas controles representativas de clonas internacionales COB70 (clona Pediátrica-Colombia); HDE288 (clona Pediátrica-Portugal); BK2464 (clona NY/Japón-USA); JP27 (clona NY/Japón-Japón); EMRSA-16 (clona-Reino Unido); HPV107 (clona Ibérica); HU25 (clona Brasileña) mostrando el fragmento de Tn554 en pesos de 120, 180 y 211 Kb.

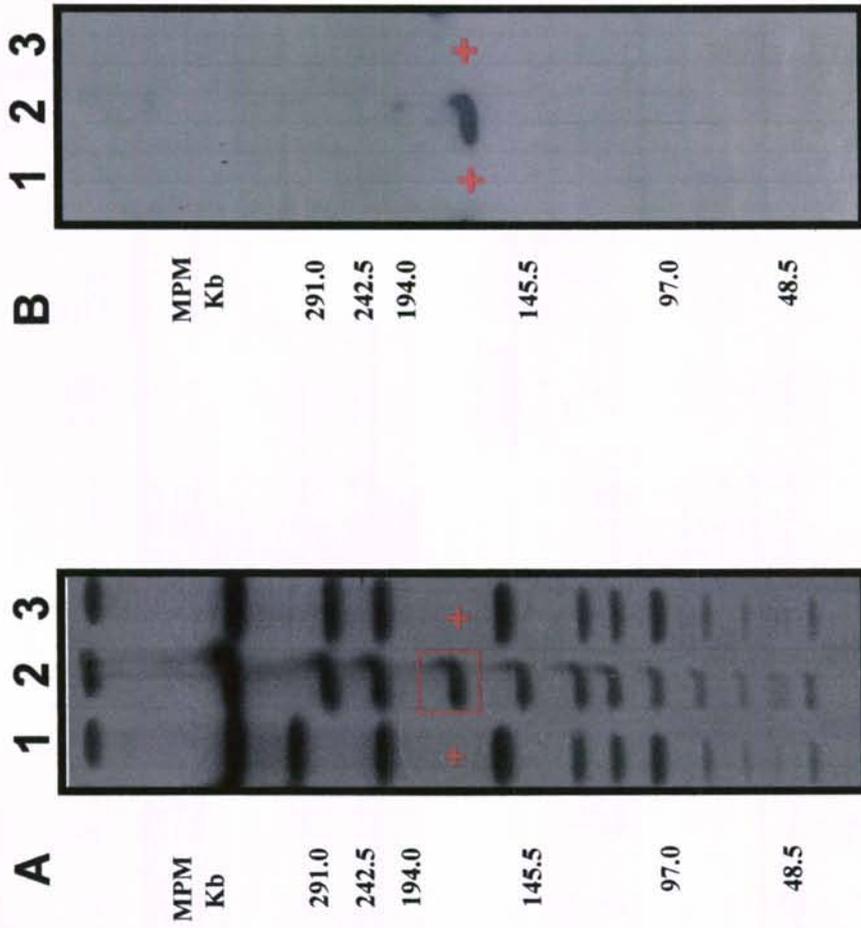


Fig. 11. Panel (A) PFGE, líneas 1 y 3 B1 y B2, indicando con una (+) la pérdida del fragmento que contiene al gen *mecA*. Línea 2 (B3) en el que se observa el fragmento que contiene el gen *mecA*. Panel (B), patrones de hibridación de *mecA*.

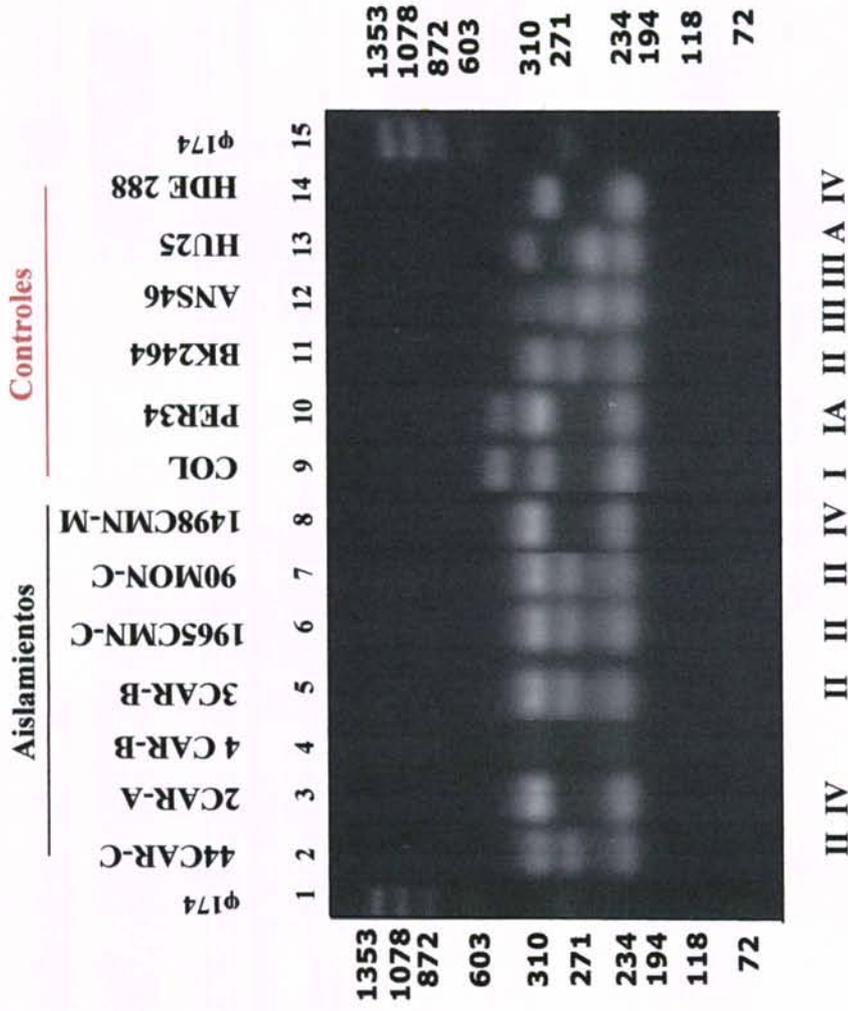


Figura 12. Patrones del casete cromosomal estafilocócico (SCC*mec*) de las clonas M, A, B y C. Carriles 1 y 15 MPM φ 174, líneas 2, 6, 7, SCC*mec* II, cepas 44CAR, 1965CMN, 90MON, Clona C, carril 3 SCC*mec* IV, cepa 2CAR, clona A, línea 4, 4CAR no amplificado, subtipo B1, línea 5 SCC*mec* II, cepa 3CAR, clona B, carril 8, 1498CMN, SCC*mec* IV, clona M; carriles 9-14 cepas controles representativas de clonas internacionales COL (clona arcaica-Inglaterra);PER34 (clona Ibérica-España); BK2464 (clona NY/Japón-USA); ANS46 (clona-Australia); HU25 (clona Brasileña); HDE288 (clona Pediátrica-Portugal); SCC*mec* I, IA, II, III, IIIA y IV respectivamente.

12. CUADROS

Cuadro 1. Clonas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes aisladas en diferentes regiones geográficas

Clona	País	Año	SCC <i>mec/Spa</i>	MLST (ST)
Clona Ibérica	España, Portugal, Italia, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Francia, República Checa y Estados Unidos	1989	IA/ YHFGFMBQBLO	247
Clona Brasileña	Brasil, Portugal, Argentina, Uruguay, Chile y República Checa	1993	XKAOMQ	239
Clona Húngara	Hungría, Taiwán y China	1993	WKAKAOKAOMQ	239
Clona Pediátrica	Portugal, Polonia, Estados Unidos y Argentina	1996	TJMBDMGMK	5
Clona Nueva York/Japón	Nueva York, Nueva Jersey, Pensilvania, Connecticut, Tokio, Japón y México	1996	TJMBDMGMK	5

Cuadro 2. Origen de las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes analizadas

Código Hospital ^a	Ciudad	Número de camas	Número de servicios	Total de aislamientos	Fecha
H-GUA	Guadalajara, Jalisco	707	31	330	Ene.1999- Oct.2004
H-MON	Monterrey, Nuevo, León	500	21	115	Oct.2001- Oct.2004 ⁺
H-CMN	México, D.F.	200	7	110	Ene.1997- Oct.2004
H-CAR	México, D.F.	300	9	33	Apr.2002- Oct.2004 ⁺
Total 588					

^aCódigo del hospital: (H-MON) Hospital Universitario de Monterrey;(H-GUA) Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”; (H-CMN) Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional, Siglo XXI-Instituto Mexicano del Seguro Social; (H-CAR) Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”.

⁺Las cepas correspondientes al año 2003 no fueron recobradas.

Cuadro 3. Caracterización antibiotípica y genotípica de las clonas de SAMR presentes en los cuatro hospitales

Características	Clona M	Clona A	Clona B	Clona C
Hospital	H-CMN	H-CARD	H-CARD	H-MON; H-GUA, H-CMN; H-CARD
Antibiotipo ^a (resistencia)	GEN	CLA, CD; ERY	CIP; CLA; CD; ERY	CIP; CLA; CD; ERY; GEN ^b
No. de subtipos	5	5	3	26
<i>SmaI-mecA</i> ^e	~180	~180	~211	~211
<i>SmaI-Tn554</i> ^e	NH	~180	~640-211	~640-211
Tipos de SCC <i>mec</i>	IV	IV	IV*/II	II
Tipos de <i>spa</i> ^c	183	183	33, 204, 275	2
ST ^d	30	30	30*/36	5

^aAntibióticos: Todas fueron resistentes a β-lactámicos CLA- claritromicina; CD – clindamicina; ERY – eritromicina GEN - gentamicina; CIP - ciprofloxacina.

^b Únicamente los aislamientos del CMN fueron resistentes a gentamicina

^c Código de la secuencia de la proteína A

^d Secuencia tipo obtenida por MLST

* ST 30/ SCC*mec* IV Presente solo en las cepas con patrón B1 y B2

^e Fragmentos de hibridación en Kb. No homología con el transposón (NH).

Cuadro 4. Características de las cepas controles utilizadas en el estudio

TECNICA	CEPAS
Susceptibilidad antimicrobiana	<i>S.aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> ATCC 29212, <i>Echerichia coli</i> ATCC 35218, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.
Electroforesis en campos pulsados PFGE	HU25 clona Brasileña-Brasil; HPV107 clona Ibérica-España; HDE288 clona Pediátrica-Portugal; BK2464 clona NY/Japón-USA; JP27 clona NY/Japón-Tokio; 96/32010 clona EMRSA-16-Reino Unido.
Casete cromosomal estafilococico (SCCmec)	COL SCCmec I; PER34 SCCmec IA; BK2464 SCCmec II; ANS46 SCCmec III; HU25 SCCmec IIIA; HDE288 SCCmec IV.

“Los miembros del jurado designados por la Comisión del Posgrado en Biología Experimental, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la presente tesis titulada “Análisis clonal y detección del gen mec A y el transposón Tn554 en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes causantes de infección nosocomial en la República Mexicana” con fecha 15 de Febrero del 2007”.

JURADO DE EXAMEN



Presidente

Dr. Edmundo Bonilla González

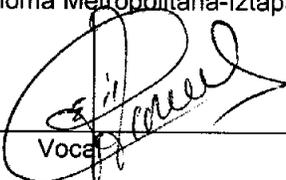
Departamento. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

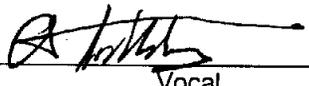
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

Dra. Celia Alpuche Aranda

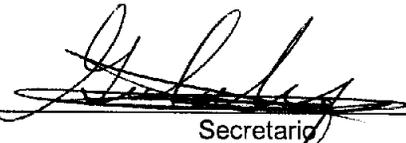
Departamento de Medicina Experimental
Universidad Nacional Autónoma de México



Vocal

Dr. Carlos Eslava Campos

Departamento de Salud Pública
Universidad Nacional Autónoma de México



Secretario

Dra. Guadalupe Ayala Aguilar
Jefe del Departamento de Desarrollo Biotecnológico
Instituto Nacional de Salud Pública