Kasmera 42(2): 116 - 130, julio-diciembre 2014
ISSN 00755222 / Depósito legal 196202ZU39

Tipo de cassette cromosómico estafilocócico en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

Staphylococcal Chromosomal Cassette Type in Clinical Strains of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus

Castellano González, Maribel J.[1], Cavazza Porro, María E.[2] y Perozo Mena, Armindo J.[3]

[1]Cátedra de Bacteriología General. Departamento de Microbiología. Escuela de Bioanálisis. LUZ, Maracaibo, Venezuela.
[2]Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit. Laboratorio de Microbiologia Molecular. Caracas, Venezuela.
[3]Cátedra de Práctica Profesional de Bacteriología. Centro de Referencia Bacteriológica Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. Departamento de Microbiología. Escuela de Bioanálisis. LUZ. Maracaibo, Venezuela.

Resumen

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SAMR) presenta una proteína de unión a la penicilina, la PBP2a codificada por el gen *mecA,* que se encuentra en un elemento genético móvil llamado *cassette* cromosómico estafilocócico (*SCCmec)*. El presente estudio se realizó para examinar la susceptibilidad antimicrobiana, producción de leucocidina de Panton-Valentine (PVL) y tipo de *SCCmec* presente en cepas aisladas de 54 pacientes en un hospital durante un período de tres meses. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron mediante el método de difusión en agar y el *mecA, PVL* y los tipos de *SCCmec* se determinaron usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Veintinueve (29) cepas correspondieron al *SCCmec* tipo IV (54%), 22 al *SCCmec* tipo I (40%), 2 al *SCCmec* tipo IA (4%) y 1 al *SCCmec* IIIB (2%). Diecinueve cepas (35%) resultaron positivas para PVL, todas *SCCmec* tipo IV. Cuarenta cepas (74%) expresaron multi-resistencia. Todos los aislamientos fueron sensibles a vancomicina, teicoplanina, linezolid, tigeciclina y moxifloxacina. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia del gen PVL, la resistencia antimicrobiana y el tipo de *SCCmec* (p>0,05). Los *SCCmec* tipos IV y I son los más frecuentes en las cepas SAMR circulantes en la institución.

Palabras clave: *S. aureus* meticilino-resistente; *SCCmec*; resistencia; PVL.

Recibido: 03-09-14 / Aceptado: 29-09-14

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) presents a protein that binds to penicillin, the PBP2a, encoded by the gene *mecA,* located in a mobile genetic element called the staphylococcal chromosomal cassette *(SCCmec)*. This study was conducted to examine the antimicrobial susceptibility, Panton-Valentine leukocydine (PVL) production and the staphylococcal chromosomal cassette *mec (SCCmec*) type for MRSA isolates from 54 patients in a hospital during a three-month period. Antimicrobial susceptibility testing was performed using an agar diffusion method; *mecA,* PVL and *SCCmec* types were determined using polymerase chain reaction (PCR). Twenty-nine strains (29) corresponded to type IV *SCCmec* (54%), 22 to type I *SCCmec* (40%), 2 to type IA *SCCmec* (4%) and 1 to *SCCmec* IIIB (2%). Nineteen strains (35%) were positive for PVL, all of type IV *SCCmec*. Forty strains (74%) expressed multiresistance. All MRSA isolates were susceptible to vancomycin, teicoplanin, linezolid, tygecicline and moxifloxacina. No statistically significant association was found between the presence of the PVL gene, antimicrobial resistance and the *SCCmec* type ($p>0.05$). *SCCmec* types IV and I are the most frequent in the MRSA strains circulating in the institution.

Key words: Methicillin-resistant *S. aureus, SCCmec,* resistance, PVL.

Introducción

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SAMR) es un patógeno importante que presenta una proteína de unión a penicilina, la PBP2a, codificada por el gen *mecA* que se encuentra en un elemento genético móvil llamado cassette cromosómico estafilocócico (*SCCmec*) (1).

Se han descrito cinco clases de complejos genéticos *mec* (A, B, C1, C2 y D), y cinco alotipos de complejos genéticos *ccr* (tipos 1, 2, 3, 4 y 5). Diferentes combinaciones de las clases de complejos genéticos *mec* y de los alotipos *ccr* dan lugar a varios tipos de *SCCmec* (I [1B], II [2 A], III [3 A], IV [2B], V [5C2], VI [4B]), que son clasificados a su vez de acuerdo con las variaciones en la región "J" (2), y se diferencian también, según los determinantes genéticos adquiridos como resultado de la integración de plásmidos y transposones, tales como *Tn554,* el cual codifica resistencia a macrólidos, clindamicina y estreptogramina B (3).

Más recientemente, un nuevo tipo de *SCCmec:* 5C1, designado tipo VII, se describió en Suecia en una cepa SAMR adquirida en la comunidad (SAMR-C) y otro tipo de cassette llamado tipo VIII, en una cepa epidémica SAMR adquirida en un centro hospitalario (SAMR-H) de Canadá (2).

Además, en el sitio web del grupo de trabajo internacional sobre la clasificación de los elementos del cassette estafilocócico (IWG-SCC) (4), se enumeran algunos *mec, ccr* y tipos de *SCCmec* adicionales que no se han descrito en la literatura publicada. Debido a la amplia diversidad que se ha observado en la organización genética de los elementos del *SCCmec*, el IWG-SCC estableció criterios para estandarizar la clasificación de los elementos del cassette, por lo que se requiere asesoramiento y que la secuencia completa de nucleótidos sea determinada para cada nuevo elemento del cassette antes de su asignación a un tipo determinado de *SCCmec* (5).

La mayoría de los aislamientos provenientes de los hospitales pertenecen a los tipos I, II y III; mientras que los aislamientos derivados de la comunidad, en su mayoría pertenecen al tipo IV. Recientemente, el *SCCmec* tipo IV ha surgido en hospitales, y

este cambio en la epidemiología hospitalaria ha tenido impacto en las opciones terapéuticas para las infecciones relacionadas con estas cepas y su control (1).

Las cepas de *S. aureus* adquiridas en la comunidad (SAMR-C) difieren de las cepas hospitalarias (SAMR-H) en la susceptibilidad a otros grupos de antibióticos; por lo general, las cepas hospitalarias son más resistentes a los antimicrobianos. Por otra parte, las cepas de SAMR-C poseen numerosos factores de virulencia, que las distinguen, entre ellos la toxina Panton–Valentine (PVL), una leucocidina responsable de destruir leucocitos y producir necrosis tisular, la cual es codificada por dos genes cotranscritos (*lukS–PV* y *lukF–PV*) que residen en un profago, y cuya presencia se ha asociado con el agravamiento de las infecciones ocasionadas por estas cepas en jóvenes y niños (6).

Es importante destacar que las cepas de SAMR-C han sido aisladas en los establecimientos de salud, lo que ha ocasionado que ambos tipos de cepas circulen en los hospitales y las comunidades. En Venezuela, específicamente, en el Estado Zulia, se desconoce la existencia de estudios que permitan determinar el predominio de alguno de los tipos de *cassette* cromosomómicos *SCCmec* presentes en las cepas SAMR circulantes. La introducción de técnicas de tipificación molecular ha provisto de nuevas herramientas para el estudio de este microorganismo y su resistencia a los antibióticos. Por ello, su aplicación en esta investigación, permitió conocer las características de las cepas circulantes en una de las mayores unidades hospitalarias de Maracaibo, lo que proporciona información de importancia epidemiológica para los programas de control de las infecciones estafilocócicas, a través del logro de los siguientes objetivos: establecer el tipo de *SCCmec* presente, detectar el gen que codifica para PVL y determinar la resistencia antimicrobiana en cepas SAMR.

Materiales y métodos

Población de estudio y muestras

Se estudiaron 54 cepas SAMR aisladas de distintos tipos de muestras de pacientes hospitalizados, que fueron procesadas en el laboratorio de bacteriología del centro hospitalario, en un período de tres meses.

Todos los procedimientos durante la ejecución de la presente investigación se realizaron de acuerdo a las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en seres humanos, la declaración de Helsinki, ratificada por la 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia en el año 2000 (7) y el Código de Bioseguridad y Bioética de la República Bolivariana de Venezuela (8). Se contó además, con la autorización del Comité de Ética del Hospital.

Aislamiento bacteriano y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

Las muestras fueron inoculadas y procesadas de acuerdo a la metodología convencional (9) y las cepas de *S. aureus* fueron identificadas utilizando el sistema automatizado VITEK II® (BIOMÉRIEUX). La susceptibilidad a meticilina fue determinada utilizando el método de difusión con disco de cefoxitina (30ug), de acuerdo a los lineamientos del Centro para la Estandarización de Laboratorios Clínicos (CLSI) (10) y verificada mediante amplificación del gen *mecA* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .

Amplificación del gen *mecA* y *pvl* por PCR

Extracción del ADN genómico de *S. aureus*: se utilizó la técnica de lisis enzimática. A partir de un cultivo puro de 24 horas, se tomó un mínimo de 10 colonias, y se transfirió a un tubo con 400 µl de buffer de lisis (buffer TE) (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 25 ng/µl de lisostafina) se incubó a 37°C por 1 hora. Se le agregó 40 µl de SDS (dodecil-sulfato de sodio) al 1% y 10 µl de proteinasa K a una concentración de 250 ng/µl, y se incubó a 50°C por 1 hora. Se realizó la extracción con fenol-cloroformo 1:1 (agregando 400 µl de la mezcla).

La mezcla se agitó y se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos. Con una pipeta, se extrajo la fase acuosa y se pasó a un nuevo tubo eppendorf. El ADN contenido en la fase acuosa fue precipitado con 1 ml de etanol absoluto (100%) y se guardó a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, previa descongelación, este tubo se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y al sedimento se le agregó 400 µl de etanol al 70%.

El sobrenadante fue descartado por inversión. El sedimento se dejó secar durante 30 minutos, colocando los tubos eppendorf destapados sobre un papel absorbente. El sedimento se resuspendió en 100 µl de buffer TE 10 mM. Se utilizaron 3 µl de la muestra para realizar los ensayos de amplificación.

Amplificación del gen *mecA* y *PVL* mediante la Reacción en cadena de la polimerasa: Los primers utilizados durante el proceso de amplificación, fueron: 5'-AAC AGG TGA ATT ATT AGC ACT TGT AAG-3' y 5'-ATT GCT GTT AAT ATT TTT TGA GTT GAA-3', para *mecA* y 5'-AAT CTT TGT CGGTAC ACG ATA TTC TTC ACG-3' y 5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3', se utilizaron como controles para la identificación de *S. aureus*. (11).

Para la detección de PVL, se utilizó el mismo ciclo de reacción, empleando como iniciadores de la reacción los siguientes: *Luk-PV-1*: 5'-ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A-3' y *Luk-PV-2:* 5'- GCA TCA AST GTA ATT GGA TAG CAA AAG C-3'(12).

Se tomó una alícuota de 3 µl del ADN previamente extraído de *S. aureus*, la cual se transfirió directamente a 20 µl de mezcla para PCR, conteniendo: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 9,0); 0,1% Tritón X-100; 2,5 mM MgCl2; 0,4 µM de cada uno de los primers, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato y 0,5 U de ADN polimerasa Taq (Promega®). Las mezclas de PCR fueron sometidas a un ciclo térmico en un termociclador modelo PTC-200 (MJ Research, Inc®, Massachusetts, USA), como se describe a continuación: 5 minutos a 96°C; 35 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. Luego, 5 minutos a 72°C y conservados indefinidamente a 4°C.

Los productos de la amplificación (5 µl) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% conteniendo 0,5 µg/ ml de bromuro de etidio, en buffer tris-borato-EDTA (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) a 80 V/cm, durante 90 minutos. Los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta (254 nm) y se fotografiaron con una cámara digital. El tamaño de los productos de amplificación del PCR fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb. De manera que, la presencia de una banda de 174 pb fue indicativa de la presencia de *mecA* y una de 433 pb, de la presencia del gen que codifica para PVL. Todas las cepas amplificaron la banda de 108 pb, correspondiente al control interno de identificación de *S. aureus*.

Determinación del tipo de *SCCmec* presente en las cepas SAMR

La tipificación del elemento cromosómico que porta el gen de resistencia a meticilina se efectuó mediante PCR de tipo múltiplex basada en el uso de iniciadores para detectar las secuencias de los diferentes tipos de *SCCmec*. Se seleccionaron 8 *locus* con base a secuencias previamente descritas (Tabla 1) (13).

En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: tampón de PCR a una concentración de X1, $MgCl_2$ 2 mM, dNTP (dinucleótido trifosfato) 25 µm, y los siguientes iniciadores y sus concentraciones para cada *locus*: para el *locus* A (CIF2 F2 65 pM y CIF2 R2 75 pM), para el *locus* B (KDP F1 Y KDP R1, ambos a 29 pM), para el *locus* C (MECI P2 y MECI P3, ambos a 81 pM), para el *locus* D (DCS F2 77 pM y DCS R1 63 pM), para el *locus* E (RIF4 F3 y RIF4 R9, ambos a 34 pM), para el *locus* F (RIF5 F10 y RIF5 R13, ambos a 66 pM), para el *locus* G (IS431 P4 75 pM y pUB110 R1 65pM) y para el *locus* H (IS431 P4 75 pM e iniciador pT181 R1 70 pM).

Para los iniciadores del control interno de amplificación (*mecA-1* y *mecA-2*) se utilizó una concentración de 50 pM. A esta mezcla para la amplificación se le añadió además, 1 unidad de Taq DNA polimerasa, 3 µl del ADN molde y, finalmente, agua grado analítico hasta completar un volumen final de 50 µl.

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 12 minutos para la desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de amplificación (45 segundos para desnaturalización a 94°C, 45 segundos para la hibridación a 55°C y 1 minuto a 72°C para el proceso de extensión) y se le adicionó una última fase de extensión de 2 minutos a 72°C y posterior enfriamiento hasta 4°C.

Los productos de la amplificación fueron separados, teñidos, visualizados y foto-

Tabla 1. *Locus*, secuencias de oligonucleótidos, tamaño esperado del producto y tipo de *SCCmec*.

Locus	Iniciador	Secuencia	Tamaño Amplificado	Tipo *SCCmec*
A	CIF2 F2	5'TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG3'	495 pb	I
	CIF2 R2	5'ATTTACCACAAGGACTACCAGC3'		
B	KDP F1	5'AATCATCTGCCATTGGTGATGC3'	284 pb	II
	KDP R1	5'CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG3'		
C	MECI P2	5'ATCAAGACTTGCATTCAGGC3'	209 pb	II, III
	MECI P3	5'GCGGTTTCAATTCACTTGTC3'		
D	DCS F2	5'CATCCTATGATAGCTTGGTC3'	342 pb	I, II, IV
	DCS R1	5'CTAAATCATAGCCATGACCCG3'		
E	RIF4 F3	5'GTGATTGTTCGAGATATGTGG3'	243 pb	III
	RIF4 R9	5'CGCTTTATCTGTATCTATCGC3'		
F	RIF5 F10	5'TTCTTAAGTACACGCTGAATCG3'	414 pb	III
	RIF5 R13	5'GTCACAGTAATTCCATCAATGC3'		
G	IS431 P4	5'CAGGTCTCTTTCAGATCTACG3'	381 pb	IA
	Pub110 R1	5'GAGCCATAAACACCAATAGCC3'		
H	IS431 P4	5'CAGGTCTCTTCAGATCTACG3'	303 pb	IIIA
	pT181 R1	5'GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC3'		

F. de I: Oliveira D, de Lencastre H 2002 (13).

grafiados como se mencionó anteriormente. Los diferentes segmentos amplificados fueron clasificados como pertenecientes a cada tipo de *cassette* estafilocócico como se describe en la Tabla 1.

Determinación de la resistencia antimicrobiana

Para determinar la resistencia a los agentes antimicrobianos, se utilizó el método de Kirby & Bauer y para la determinación de la susceptibilidad a vancomicina se empleó el método de E-test®, ambos de acuerdo a los criterios del CLSI (10). La información obtenida fue procesada mediante el programa WHONET ™ (versión 5,6).

Análisis estadístico

Para determinar si existe asociación entre las características fenotípicas y genotípicas estudiadas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado con un valor de $p<0,05$; utilizando el paquete estadístico SPSS ™ versión 21.

Resultados

La totalidad de las cepas analizadas amplificaron el fragmento de 108 pb (*S. aureus)* y el de 174 pb (*mecA*) demostrando que verdaderamente se trataba de cepas SAMR (Figura 1).

La distribución de las cepas SAMR de acuerdo al análisis de la estructura del *cassette* cromosómico determinada mediante PCR se presenta en la Figura 2.

La Figura 3 muestra los patrones de bandas para cada tipo de *cassette* cromosómico (*SCCmec*); observándose que las cepas portadoras del *SCCmec* tipo I amplificaron dos bandas, una de 342 pb y la otra de 495 pb. Las del tipo *SCCmec* IA presentaron además, una banda de 381 pb. Por su parte, las cepas con *SCCmec* tipo IIIA mostraron 3 bandas: una de 209 pb,una de 243 pb y la última de 303 pb. En las cepas con el *cassette* tipo IV se observó únicamente una banda de 342 pb.

La susceptibilidad y resistencia de las cepas SAMR estudiadas a los diversos antibióticos se presenta en la Tabla 2. Cuarenta cepas (74%) expresaron multi-resistencia (resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos). No se observó resistencia a linezolid, teicoplanina, fosfomicina, mupirocina, quinupristin/dalfopristin, vancomicina y tigeciclina. Se encontró resistencia a eritromicina, clindamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, amikacina, gentamicina, cloranfenicol, rifampicina, y cotrimoxazol. La distribución de la resistencia por tipo de *SCCmec* se muestra en la Tabla 3.

Diecinueve cepas (35%) resultaron positivas para PVL, todas portadoras del *SCCmec* tipo IV (Figura 4).

Al aplicar el chi–cuadrado, no se encontró asociación significativa entre el tipo de *SCCmec* presente, la susceptibilidad antimicrobiana y la presencia de PVL con el origen "hospitalario" de las cepas SAMR estudiadas.

Discusión

S. aureus posee una conocida habilidad para generar cambios genéticos rápidos y estabilizarlos en su genoma. Esta característica hace indispensable realizar la tipificación fenotípica y genotípica de los aislamientos obtenidos, para que la vigilancia epidemiológica permita entender el comportamiento y distribución del patógeno; y asi establecer medidas apropiadas de control de la infección y su diseminación (14).

La prevalencia de los *SCCmec* varía de un área geográfica a otra. No se encontraron muchos estudios en relación al tema en la literatura nacional; sin embargo, una investigación realizada en el oriente del país por

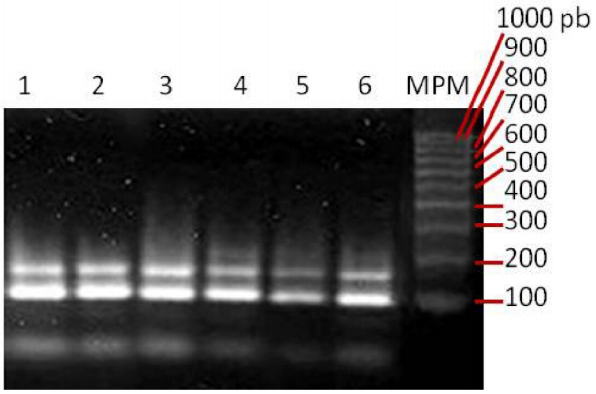


Figura 1. Detección del gen *mecA* por PCR en cepas SAMR.

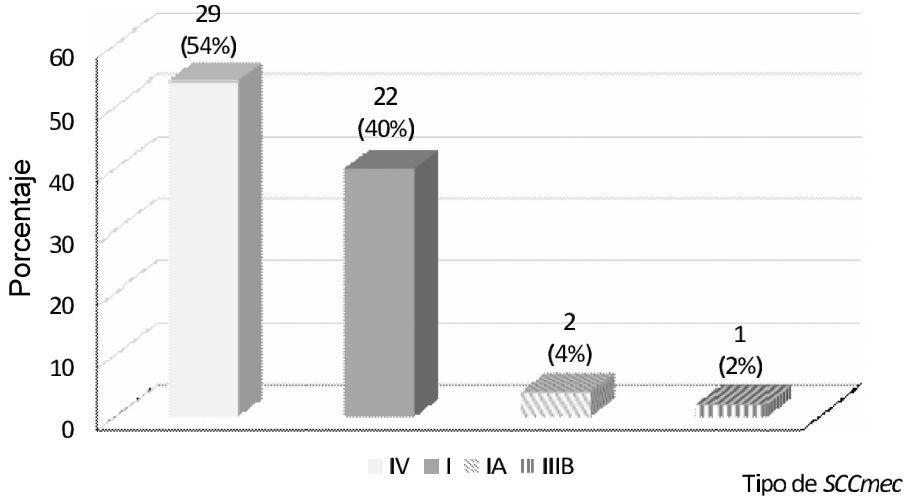
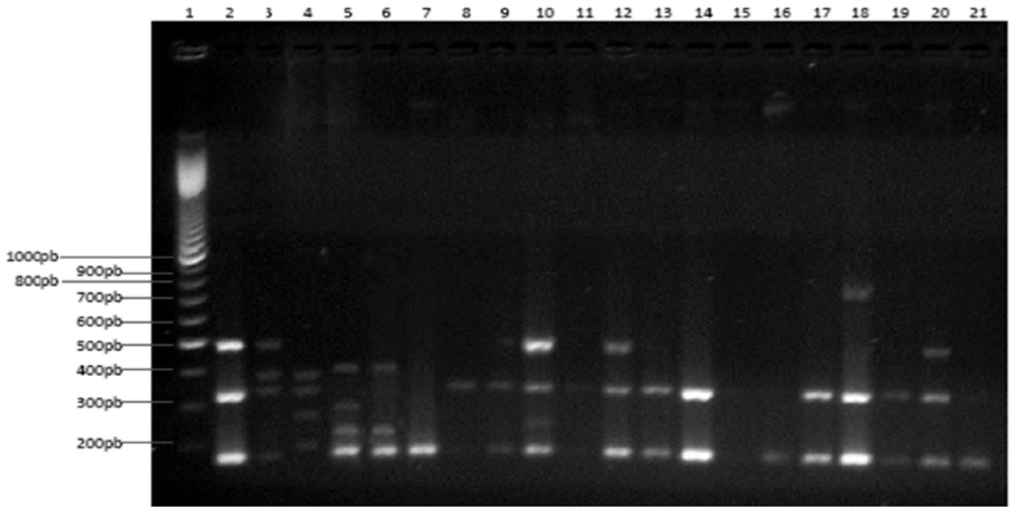


Figura 2. Tipo de *SCCmec* presente en las cepas SAMR.



Carril 1 MPM (100bp); carril 2 *SCC mec* tipo I;carril 3 *SCCmec* tipo IA; carril 4 *Sccmec* tipo II; carril 5 *SCCmec* tipo III; carril 6 *SCCmec* tipo IIIA; carril 7 *SCCmec* tipo III B; carril 8 *SCCmec* IV; carriles 9 al 21: muestras.

Figura 3. Patrones de bandas obtenidos para los diferentes tipos de *SCCmec*.

Tabla 2. Susceptibilidad y Resistencia Antimicrobiana en cepas SAMR.

Antibiótico	Resistentes (%)	Sensibles (%)
Eritromicina	83,33	16,67
Clindamicina	64,81	35,19
Amikacina	64,81	35,19
Gentamicina	64,81	35,19
Ciprofloxacina	66,67	33,33
Levofloxacina	64,81	35,19
Gatifloxacina	62,96	37,04
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1,85	98,15
Rifampicina	1,85	98,15
Cloranfenicol	7,40	92,60
Tetraciclina	7,40	92,60
Otros*	-	100,00

*Linezolid, vancomicina, teicoplanina, quinupristin/dalfopristin, fosfomicina, mupirocina y tigeciclina.

Tabla 3. Resistencia antimicrobiana según tipo de *SCCmec* en cepas SAMR.

Perfil de Resistencia	Resistencia		Tipo de *SCCmec*			
	No de cepas	%	I	IA	IIIB	IV
PG-OX	6	11,11	-	-	-	6
PG-OX-E	5	9,26	-	-	-	5
PG-OX-CIP	1	1,85	-	-	-	1
PG-OX-GM	1	1,85	-	-	-	1
PG-OX-TE	1	1,85	-	-	-	1
PG-OX-TE-E	2	3,70	-	-	-	2
PG-OX-E-CC	1	1,85	-	-	-	1
PG-OX-E-AK	1	1,85	-	-	-	1
PG-OX-E-CIP-LEV	1	1,85	-	-	-	1
PG-OX-TE-E-TSX-RA	1	1,85	-	-	-	1
PG-OX-AK-GM-E-CC-CIP-LEV-GAT	30	55,57	22	1	-	7
PG-OX-AK-GM-CIP-LEV-GAT-E-CC-C	4	7,41	-	1	1	2

PG: penicilina G; OX: oxacilina; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; GAT: gatifloxacina; E: eritromicina; CC: clindamicina; TSX: trimetoprim/sulfametoxazol; RA: rifampicina; C: cloranfenicol: AK: amikacina; GM: gentamicina.

Acuña (15) refiere resultados contrarios: *SCCmec* tipo I (66,67%) y el IV con 14,28%. En este trabajo, el *SCCmec* más frecuentemente encontrado fue el tipo IV (54%), seguido del tipo I (22%); situación similar a la descrita en Bucaramanga (Colombia) por Ma-

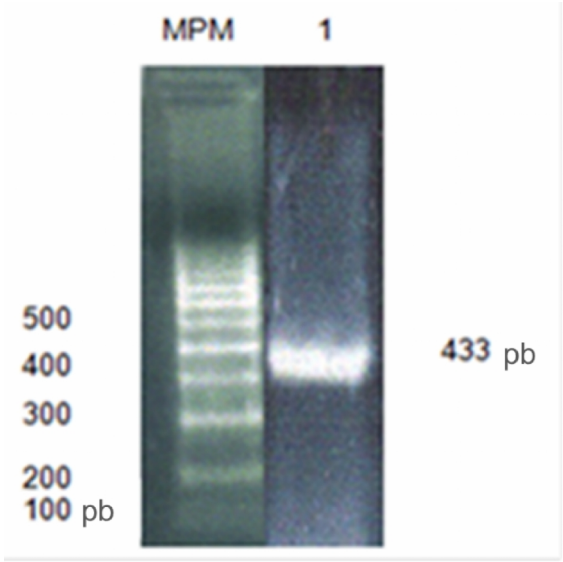


Figura 4. Detección de PVL mediante PCR en cepas SAMR.

chuca en 2012 quien obtuvo un 79% (42 aislamientos) de *SCCmec* tipo IV; seguido por *SCCmec* I con 15% (8 aislamientos); pero a diferencia de este estudio, donde todas las cepas fueron categorizadas en su *SCCmec* correspondiente, 5,67 % (3 aislamientos) resultaron no tipificables (14).

Estudios en otros países confirman el predominio de *los SCCmec* tipo IV y I (16-18), donde el tipo IV es uno de los elementos frecuentemente observados en cepas SAMR adquiridas en los hospitales; aunque inicialmente el *SCCmec* tipo IV fue descrito junto con la detección de PVL, como un marcador molecular para la clasificación de los aislamientos SAMR como comunitarios (19), la identificación de cepas SAMR portadoras del *SCCmec* tipo IV causando infecciones en hospitales ha sido masiva (20).

La presencia del *SCCmec* tipo IV en cepas hospitalarias sería explicable de dos maneras: 1) La presencia de cepas SAMR comunitarias causando infección en el hospital, fenómeno que se ha descrito en sitios con alta prevalencia de SAMR comunitario, donde una vez que las cepas SAMR provenientes de la comunidad han penetrado en el hospital, hacen su nicho en él, favorecidas por su mayor virulencia; 2) Puede tratarse de cepas SAMR nosocomiales, las cuales a diferencia de las comunitarias son PVL negativo.

Los resultados presentados se diferencian de los reportados por Martínez y cols (21) quienes refieren predominio del *SCCmec* tipo II hospitalario (98,8%; 82/83); aunque indican el aislamiento de una cepa SAMR hospitalaria portadora del *SCCmec* tipo IV (1,2%). Por su parte, Lulitanond y cols 2010 (22) encontraron en un estudio realizado en Tailandia, el predominio del *SCCmec* tipo III con 93,83% (76/81) seguido de 2,47% (2/81) del tipo II; mientras que el 3,70% de los aislamientos no resultaron tipificables (3/81).

De igual manera, en Irán, Fatholahzadeh y col (23), refieren 87%; 11% y 2% de los *SCCmec* tipo III, IIIA y IV, respectivamente. Morimoto y cols (24) realizaron un estudio en cepas SAMR en Japón, según el cual 2,1% correspondió a *SCCmec* tipo I; 71,2%“ tipo II 18,8%“ tipo III; 2,1% tipo V y 1%“ tipo VIII con un 5,8% no-tipificables; ningún aislamiento resultó productor de PVL.

Según diversos autores, SAMR-C posee un tipo de complejo genético *SCCmec* tipo IV o V (24-26); en este estudio no se aislaron cepas pertenecientes al tipo V; pero si del IV. Este *cassette* es el más pequeño hasta ahora reconocido y generalmente, no contiene otros determinantes de resistencia (24,26). Esto es consistente con la notable característica de SAMR-C, su sensibilidad a otros antimicrobianos (24,27) a diferencia del patrón típicamente multi-resistente de los aislamientos SAMR de origen hospitalario. A este respecto, los resultados observados no guardan relación con los obtenidos en los ensayos de difusión con discos en agar en la presente investigación; ya que en la mayoría de los aislamientos del *SCCmec* tipo IV, la resistencia a meticilina

estuvo asociada con resistencia a otros antibióticos, particularmente, a eritromicina, clindamicina, aminoglicósidos, quinolonas o algún otro antimicrobiano (cloranfenicol).

En este estudio, ningún aislamiento expresó el *SCCmec* tipo V ni resultó no tipificable a diferencia de lo reportado en un trabajo realizado en Egipto por Sobhy y cols (28) quienes refieren 50% (9/18) de *SCCmec* tipo V; 16,67% (3/18) de tipo IV y 33,33%(6/18) resultaron no tipificables de un total de 28 cepas SAMR; 33,33% de las cepas resultaron productoras de PVL; de las cuales 3 fueron *SCCmec* tipo V; 1 tipo IV y 2 no tipificables.

Adicionalmente, las cepas SAMR, presentan por lo general, resistencia a otras familias de antibióticos (macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas, fenicoles, aminoglicósidos e, incluso, quinolonas) (29), debido a que en *S. aureus*, el *SCCmec*, al integrarse al cromosoma bacteriano, puede transportar en forma variable genes de resistencia a otros antibióticos (30).

A diferencia de otras investigaciones, se encontró un 2% de cepas correspondientes al *SCCmec* tipo III B; sin embargo, estas cepas presentaron multiresistencia a los antibióticos (30-35).

El hecho que las cepas con *SCCmec* tipo IV expresen multirresistencia puede deberse a que han adquirido determinantes de resistencia provenientes de otras especies de estafilococos, incluyendo los coagulasa negativa. Aunque usualmente las cepas *SCCmec* tipo IV son adquiridas en la comunidad, Trindade y cols (36) las muestran como claramente nosocomiales. Se ha reportado un incremento en la frecuencia del *SCCmec* tipo IV en cepas SAMR-H, lo que indica una posible diseminación de cepas comunitarias en el hospital o que las cepas SAMR-C son descendientes de cepas salvajes de clones endémicos hospitalarios pero con ausencia de la multiresistencia antimicrobiana Por esta razón, el monitoreo de la diseminación de los aislamientos SAMR es un elemento importante para el estudio del escenario epidemiológico (37).

La multiresistencia a las drogas en SAMR está bien documentada desde hace varios años; sin embargo, en las últimas décadas, la situación en Europa, Asia y América está cambiando con la aparición de cepas SAMR que presentan un abanico estrecho de resistencia a los antibióticos. En un trabajo realizado por Zriouil y cols (32) en Marruecos, 27/28 (96,4%) de las cepas SAMR expresaron multi-resistencia, porcentaje superior al expresado en este estudio (74%).

Pérez y cols. (35) en una investigación efectuada en Brasil, señalan altas tasas de resistencia antimicrobiana para la mayoría de los antibióticos. De manera similar, en el presente trabajo, se observan elevados porcentajes de resistencia a eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina, amikacina, levofloxacina y gatifloxacina. La resistencia observada a tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazol y rifampicina, fue baja (1-7%).

En forma similar, en un estudio realizado en el 2002 en Croacia por Budimir y cols (34), la totalidad de aislamientos SARM mostró multi-resistencia a los antimicrobianos; 89% resultó *SCCmec* tipo I y 11% albergaba el *SCCmec* tipo III, todos los aislamientos fueron negativos a PVL. Por otra parte, en Turquía en una investigación con 97 cepas SAMR; 87,72% (85) tenían un *SCCmec* tipo III; 3,09%(3) eran tipo IV, 3,09% (3) pertenecieron al tipo IIIA; 1,03% (1) correspondió al tipo B e igual cantidad para el tipo II; mientras que 4 (4,12%) no pudieron tipificarse; no encontrándose la producción de PVL en cepas SAMR sino un 2,2% de cepas PVL positivas en cepas meticilino-sensibles (33).

Las cepas SAMR-C tienen un curso más agresivo que las SAMR-H, lo que sugiere la

expresión de factores de virulencia diferentes. Esta virulencia se ha relacionado principalmente a la presencia de la leucocidina PVL. La alta frecuencia con que se ha descrito la producción de PVL, hace que la detección del gen que la codifica se considere un hecho distintivo de estas cepas (38).

Al igual que lo plantea Palombarani y su equipo (25), la detección de PVL en este trabajo solo fue realizada como marcador del tipo de cassette; su expresión y funcionalidad en la patogenia de las infecciones descritas no fue uno de los fines de la presente investigación. Resultados muy diferentes se encuentran reportados. Así, Rossney y col. en un estudio realizado en Irlanda, encontraron que solo 6,70% de las cepas SAMR-C aisladas resultaron positivas para PVL, concluyendo que esta proteína no debería ser usada como un único marcador para SAMR-C (39).

La producción de PVL en las cepas estudiadas es inferior a la reportada por Giusti y cols (40) quienes de 142 cepas SAMR-C, 92 (65%) resultaron productores de PVL y por Lina y cols, según los cuales, 93% de las cepas SAMR eran PVL positivas (41). En esta investigación, las cepas productoras de PVL, eran portadoras de *SCCmec* tipo IV, característico de las cepas de origen comunitario; no obstante, éstas fueron cepas provenientes de pacientes hospitalizados.

Al igual que lo reportado por otros autores, todas las cepas resultaron sensibles a vancomicina, teicoplanina y linezolid (30-35), presentando además susceptibilidad a moxifloxacina, quinupristin/dalfopristin, fosfomicina, mupiromicina y tigeciclina.

Es preocupante lo común que se está volviendo encontrar cepas SAMR-C en ambientes nosocomiales y cepas hospitalarias en la comunidad (42-47), de hecho ya existe un solapamiento clonal y pronto, la utilidad de la electroforesis de campo pulsado y los clones quedarían sin valor epidemiológico (47).

Para concluir puede afirmarse que en las cepas SAMR circulantes en la institución, existe predominio de los tipos de *SCCmec* I y IV, con cepas multirresistentes a los antibióticos y sólo las cepas *SCCmec* tipo IV portan el determinante *pvl;* información relevante desde el punto de vista epidemiológico para el diseño de las medidas de control de las infecciones causadas por este patógeno.

Referencias bibliográficas

(1) Cavalcante F, Schuenck R, Caboclo R, Ferreira D de C, Nouér S, Dos Santos K. Tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole at clinical laboratory: can they help to characterize *Staphylococcus aureus* carrying different *SCCmec* types?Rev Soc Bras Med Trop. 2013; 46(1):100-102.

(2) Zhang K, McClure J, Elsayed S, Conly J. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A mecType 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 2008; 53(2):531-540.

(3) Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(5):1323–1336.

(4) International Working Group of Classification of Staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. Disponible en:www.sccmec.org/Pages/

SCC_TypesEN.html. Fecha de acceso:17/06/2013.

(5) Shore A, Deasy E, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S. *et al*. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA, mecI, mecR1, blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(8):3765-3773.

(6) Jiménez J, Correa M. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. IATREIA 2009; 22(2):147-158.

(7) Rothman K. Declaration of Helsinki should be strengthened. BMJ 2000 Aug 12; 321(7258):442-445.

(8) Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Código de Bioética y Bioseguridad. Tercera Edición. República Bolivariana de Venezuela. Caracas, 2009.

(9) Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D. 2011. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. American Society for Microbiology. Washington, DC. USA. Volumen I.

(10) CLSI (Clinical Laboratory Standardization Institute). Antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. Document M100/S23 Vol: 30 Nº1.2013; pp: 72-89.

(11) Martineau F, Picard F, Lansac N, Menard C, Roy P, Ouellette M, Bergeron M. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(2):231-238.

(12) Borras C. 2006. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis Doctoral. Programa de Doctorado: Microbiología Médica. Departamento de Patología y Terapéutica Experimental. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. España.

(13) Oliveira D, 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; 46:2155-2161.

(14) Machuca M. 2012. Identificación molecular de clones de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en aislamientos obtenidos de pacientes pediátricos del Hospital Universitario de Santander. Tesis de grado para optar al título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad Central de Santander. Departamento de Ciencias Básicas. Bucaramanga, Colombia.

(15) Acuña Ramírez Sarai Del Valle. Caracterización Molecular de cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio De Alcalá" de Cumaná. Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para Optar al título de Licenciado en Biología. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre. Escuela de Ciencias Departamento de Biología. Tutora: Dra. Lorena Abadía. Cumaná; Venezuela, 2008.

(16) Mendes R, Lalitagauri M, Smyth D, Shopsin B, Farrell D, Jones R. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from a phase IV clinical trial for linezolid versus Vancomycin for Treat-

ment of Nosocomial Pneumonia. J Clin Microbiol 2012; 50(11):3694-3702

(17) Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras G, Zurita J. et al. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. Clin Infect Dis. 2009; 49(12):1861-1867.

(18) Olarte N, Valderrama I, Reyes K, Garzón M, Escobar J, Castro B, Vanegas N. Colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en una unidad de cuidados intensivos de adultos de un hospital colombiano: caracterización fenotípica y molecular con detección de un clon de circulación en la comunidad. Biomédica. 2010; 30(3):353-361.

(19) Ito T, Ma X, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(7):2637-2651.

(20) Benoit S, Estivariz C, Mogdasy C, Pedreira W, Galiana A, Bagnulo H. *et al.* Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potencial cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. Emerg Infect Dis 2008; 14(8):1216-1223.

(21) Martínez-Aguilar G. 2010. Análisis de genotipos y de los tiempos de duplicación de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aisladas de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Tesis de grado para optar al título de Doctor en Ciencias Médicas. Facultad de Medicina. Universidad de Colima. México.

(22) Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux R, Wilailuckana C, Kaewkes W, Vorachit M, Ito T, Hiramatsu K. Preliminary report of *SCCmec*-types and antimicrobial susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a university hospital in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2010; 41(4):920-927.

(23) Fatholazadeh B, Emaneimi M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi M. Staphylococcal cassette chromosome *mec (SCCmec)* analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2008; 14(3):217-220.

(24) Morimoto M, Miyamoto H, Murakami S, Fukuoka M, Nishimiya T, Osawa H. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types and Antimicrobial Susceptibilities of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Our Hospital. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi. 2013;23(2):61-67.

(25) Palomabarini S, Gardella N, Tuduri A, Figueroa S, Sly R, Corazza R. *et al*. Infecciones adquiridas en la comunidad por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en un hospital de agudos. Rev Argent Microbiol 2007; 39:151-155.

(26) Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aok K, Oguchi, A. *et al*. Genome and virulence determinants of high virulence community-adquired MRSA. Lancet. 2002; 359(9320):1819-1827.

(27) Lu P, Chin L, Peng C, Chiang Y, Chen T, Ma L. et al. Risk factor and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. J Clin Microbiol 2005; 43:132-139.

(28) Sobhy N, Aly F, El Kader, Ghazal A, Elbaradei A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin and soft tissue infections (in a sample of egyptian population): analysis of *mec* gene and staphy-

lococcal cassette chromosome. Braz J Infect Dis 2012; 16(5):426-431.

(29) Ma X, Ito T, Tientsasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S. *et al.* Novel type of staphylococcal cassette cromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:1147-1152.

(30) Londoño J, Ortiz G, Gaviria A. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en personal de la unidad de terapia intensiva de la Clínica Universitaria Bolivariana, Medellín 2004. Infectio. 2006; 10(3):160-166.

(31) Tibavizco D, Rodríguez J, Cuervo S, Cortes J. Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. Rev. Biomédica.2007; 27 (2):294-307.

(32) Zriouil, S, Bekkali, M, Zerouali K. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage at the Ibn Rochd University Hospital Center, Casablanca, Morocco. Braz J Infect Dis 2012; 16(3):279-283.

(33) Gülmez D, Sancak B, Ercis S, Karakaya J, Hasçelik G. Investigation of *SCCmec* types and Panton-Valentine leukocidin in community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* strains: comparing skin and soft tissue infections to the other infections. Mikrobyol Bul. 2012; 46(3):341-351.

(34) Budimir A, Deurenberg R, Plecko V, Vink C, Kalenic S, Stobberingh E. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from Croatia. J. Antimicrob Chemother 2006; 57(2):331-334.

(35) Perez L, D'Azevedo P. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in south Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008; 50(3):135-137.

(36) Trindade P, Pacheco R, Costa S, Rossi F, Barone A, Mamizuka E. *et al.* Prevalence of *SCCmec* type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43:3435-3437.

(37) Okuma K, Iwakawa K, Turnidge J, Grubb W, Bell J, O'Brien F. *et al.* Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol 2002; 40:4289-4294.

(38) Ho P, Cheung C, Mak G, Tse C, Ng T, Cheung C. *et al.* Molecular epidemiology and household transmission of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57:145-151.

(39) Rossney A, Shore A, Morgan P, Fitzgibbon M, O'Connell B, Coleman D. The Emergence and Importation of Diverse Genotypes of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Harboring the Panton-Valentine Leukocidine Gene (pvl) Reveal that PVL is a Poor Marker for Community-Acquired MRSA Strains in Ireland. J Clin Microbiology. 2007; 45: 2554– 2563.

(40) Giusti A, Baroni M, Mendosa M, Nagel A, Virgolini S, Ochoteco C. *et al. Staphylococcus aureus* meticilino-resistente adquiridos en la comunidad: Detección de leucocidina de Panton-Valentine y su relación con el sitio de aislamiento en pacientes de la ciudad de Santa Fe – Argentina. Rev Panam Infect 2011; 13(2):8-11.

(41) Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M, Gauduchon V. *et al.* Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and

pneumonia. Clin Infect Dis. 1999; 29(5):1128-1132.

(42) Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N,*et al*. A Panton- Valentine Leukocidine (PVL)-Positive Community- Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain, Another Such Strain Carrying a Multiple-Drug Resistance Plasmid, and Other More- Typical PVL-Negative MRSA Strains Found in Japan. J Clin Microbiology 2006; 43: 3356–3363.

(43) Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W, Silva M. et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. Rev Med Hered. 2010;21(1):4-10.

(44) Noriega L, González P, Hormazábal J, Pinto C, Canals M, Munita J. et al. *Staphylococcus aureus* comunitario resistente a cloxacilina: Comunicación de los primeros cinco casos descritos en Chile. Rev. Med. Chile. 2008; 136(7):885-891.

(45) Miller L, Kaplan S. *Staphylococcus aureus*: A Community Pathogen. Infectious Diseases Clinical of North America. 2009; 23: 35–52.

(46) Campana S, Cocchi P, Döring G, Taccetti G, Moroney S. Emergence of an epidemic clone of community associated methicillin- resistant panton-valentine leukocidin-negative *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patient populations. J Clin Microbiol 2007; 45:3146-3147.

(47) Lozano D, Díaz L, Echeverry M, Pineda S, Máttar S. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montería-Córdoba. Universitas Scientiarum 2010; 15 (2):159-165.