
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
ÁREA BIOLOGÍA, SUBÁREA MICROBIOLOGÍA



TESIS DE MAESTRÍA



***Staphylococcus aureus* meticilino resistente:
clones distribuidos en la comunidad y en el hospital
2002-2012**



Lic. Mariana López Vega

Orientadora: Dra. Teresa Camou

Lugar de Ejecución: Departamento de Laboratorios de Salud Pública

Montevideo, Uruguay

2014



AGRADECIMIENTOS

A Teresa Camou por impulsarme a realizar la maestría y motivarme en momentos difíciles; por su apoyo constante y por sus enseñanzas de todos los días.

A los miembros del Tribunal por brindarme su tiempo para corregir esta tesis.

A Gabriela García por todo su apoyo y su ayuda tanto en la tesis como diariamente en la Unidad.

A mis compañeros de Bacteriología, Gabriel Pérez, Adriana Nabón, Alfredo Sirok y Virginia García, por sus aportes y sus palabras de aliento.

A Rosario Palacio por cederme generosamente parte de las cepas de este estudio, así como también datos de los pacientes producto de su esfuerzo personal de recolectarlos.

*A Marta Mollerach y Noella Gardella por cederme generosamente cepas de referencia y compartir su experiencia en el estudio de *Staphylococcus*.*

A María Albini por abrirme las puertas del laboratorio cuando inicié mi pasantía.

A las autoridades del MSP y en especial a la Dirección del Laboratorio por permitirme realizar esta tesis.

A todos mis compañeros del DLSP, en especial a mis compañeros de Virología, Unidad de la que formé parte y de la cual guardo lindos recuerdos y aprendizajes. Gracias por el tiempo compartido y por entender mi gusto por las bacterias.

Al Comité de eventos, Vivi F, Vivi R, Noe, Leti, Ana, Dinorah y Dora, gracias amigas por estar siempre.

A mis padres, por mostrarme el camino y apoyarme siempre en todo. Dedicada a ellos por impulsarme a seguir mi vocación.

A Natalia, Leonardo, Vicente y Salvador, por el amor y la alegría.

A toda mi familia, en especial a mis abuelos por los tesoros que conservo de la niñez.

A Andrés, compañero de todos los momentos, de sueños y lucha codo a codo. Por darme fuerza cuando me falta y enseñarme que la vida es tan simple y tan linda.

ABREVIATURAS

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

SAMR-hosp: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente hospitalario

SAMR-com: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comunitario

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible

SCC*mec*: del inglés, “*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*”

PVL: Leucocidina Pantón-Valentine

TSST-1: Toxina de Síndrome de Shock Tóxico 1

IPPB: Infecciones de Piel y Partes Blandas

ACME: del inglés, “Arginine Catabolic Mobile Element”

PBPs: del inglés, “Penicillin Binding Proteins”

MS_B: Fenotipo de resistencia a macrólidos y estreptogramina B

MLS_B: Fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B

iMLS_B: Fenotipo inducible de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B

cMSL_B: Fenotipo constitutivo de resistencia a macrólidos lincosamidas y estreptogramina B

VSSA: del inglés, “Vancomycin Sensible *Staphylococcus aureus*”

VISA: del inglés, “Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*”

hVISA: del inglés, “Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*” heteroresistente

VRSA: del inglés, “Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*”

PAP-AUC: del inglés, “Population Analysis Profile- Area Under Curve”

PFGE: del inglés, “Pulsed Field Gel Electrophoresis”

MLST: del inglés, “Multilocus Sequence Typing”

ST: del inglés, “Sequence Type”

CC: Complejo clonal

CDC: del inglés, “Center for Disease Control and Prevention”

CLSI: del inglés, “Clinical and Laboratory Standard Institut”

ATCC: del inglés, “American Type Culture Collection”

NCTC: del inglés, “National Collection of Type Cultures”

INDICE

1- RESUMEN	3
2- INTRODUCCIÓN	4
2.1-Importancia del tema	4
2.2- <i>Staphylococcus aureus</i> y su relevancia clínica	5
2.2.1- Microorganismo	5
2.2.2- Relación huésped – microorganismo	5
2.2.3- Factores de virulencia	6
2.2.4- Tipos de infección	9
2.2.5- Genoma	10
2.3- Resistencia a los antibióticos	12
2.3.1- Resistencia a β -lactámicos	12
2.3.2- Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B.....	15
2.3.3- Resistencia a glicopéptidos	16
2.4- Evolución de la resistencia en <i>S. aureus</i>	17
2.4.1- <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente: origen y evolución.....	19
2.4.2- Métodos de estudio	20
2.4.3- <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente de origen hospitalario	21
2.4.4- <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente de origen comunitario	22
2.4.5- Antecedentes nacionales de SAMR-hosp	25
2.4.6- Antecedentes nacionales de SAMR-com	25
2.5- Desarrollo de vacunas	27
3- JUSTIFICACIÓN	29
4- OBJETIVOS	31
4.1- Objetivo general	31
4.2- Objetivos específicos	31
5- MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1- Material biológico	32
5.2- Métodos	34
5.2.1- Métodos fenotípicos	34
5.2.2- Métodos genotípicos	36
6- RESULTADOS	39
6.1- Aspectos epidemiológicos	39

6.2- Susceptibilidad antimicrobiana	40
6.3- Presencia del gen <i>mecA</i> y tipos de casete <i>SCCmec</i>.....	44
6.4- Factores de virulencia	49
6.5- Análisis de pulsotipos por PFGE	51
7- DISCUSIÓN.....	59
7.1- Aspectos epidemiológicos.....	59
7.2- Susceptibilidad antimicrobiana	60
7.3- Marcadores moleculares: <i>SCCmec</i>, <i>PVL</i> y <i>PFGE</i>	61
8- CONCLUSIONES.....	65
9- PERSPECTIVAS	67
10- REFERENCIAS	68
ANEXOS	

1- RESUMEN

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) puede formar parte de la microbiota normal o ser agente de infecciones, incluyendo procesos invasivos severos.

La resistencia a meticilina convirtió a este microorganismo en un agente frecuente de infección nosocomial a escala mundial. En años recientes un nuevo tipo de *S. aureus* meticilino resistente (SAMR), diferente de aquel de origen hospitalario (SAMR-hosp), ha emergido en la comunidad (SAMR-com), fundamentalmente como agente de infecciones de piel y partes blandas y se ha extendido mundialmente.

El primer caso de SAMR-com se reportó en Uruguay en 2001 y en 2003 ocurrió un extenso brote epidémico que se inició en las cárceles. Luego de diseminarse por todo el país y afectar a miles de personas, el número de casos fue descendiendo paulatinamente en los años subsiguientes.

En esta tesis se propuso caracterizar fenotípica y genotípicamente una colección de cepas de SAMR aisladas de pacientes hospitalizados y de la comunidad, durante un período de 10 años (2002-2012), para explorar su diversidad y su distribución.

En los pacientes comunitarios, la mayoría de las infecciones fueron de piel y partes blandas y la mediana de edad fue de 25 años y medio. En los pacientes hospitalizados la mayoría de las infecciones fueron invasivas y la mediana de edad fue de 60 años.

Las cepas de pacientes hospitalizados mostraron un alto porcentaje de resistencia a antibióticos, el fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, mayoritariamente constitutivo, a diferencia de las de pacientes comunitarios que mostraron mayor porcentaje de sensibilidad y un 30% de fenotipo inducible.

Todas las cepas fueron sensibles a vancomicina por concentración inhibitoria mínima, pero por método de tamizaje se detectaron 6 cepas con fenotipo heteroresistente de sensibilidad disminuída a vancomicina.

Se comprobó la presencia mayoritaria en la comunidad, desde el año 2003, de cepas USA1100, con SCC*mec* tipo IV, leucocidina Pantón-Valentine (PVL) y susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos. También se identificaron algunas cepas USA100.

En el hospital se detectó el pulsotipo D, que corresponde al clon brasileño, con perfil de multiresistencia a los antibióticos (incluido trimetoprim/sulfametoxazol), SCC*mec* tipo III y sin PVL. También se detectaron cepas USA100; así como cepas con el mismo perfil del clon cordobés y de USA1100 aunque estas últimas probablemente correspondan a casos adquiridos en la comunidad.

2- INTRODUCCIÓN

2.1-Importancia del tema

Staphylococcus aureus es un importante patógeno del hombre, capaz de causar una gran variedad de infecciones, desde impétigo hasta infecciones severas con riesgo de vida.

También es un integrante habitual de la microbiota de portadores asintomáticos, quienes constituyen una fuente de dispersión. La transmisión de este microorganismo puede ser por contacto de persona a persona, a través de objetos contaminados o por animales domésticos, como ganado vacuno, cerdos y mascotas de compañía.

Traumas accidentales o provocados por intervenciones médicas que dañan la barrera constituida por la piel, así como otras enfermedades de base (diabetes, enfermedad renal crónica) o diferentes niveles de inmuno-compromiso constituyen factores predisponentes para las infecciones estafilocócicas.

S. aureus es naturalmente sensible a todos los antibióticos, pero ha demostrado poseer una extraordinaria habilidad para adquirir resistencia, ya que han sido desarrollados por este microorganismo mecanismos contra la mayoría de los antibióticos disponibles.

Esta resistencia representa una carga considerable para el sistema de salud, fundamentalmente por las infecciones y brotes hospitalarios causados por SAMR-hosp. En 2007 se registraron en Europa, aproximadamente 170.000 infecciones hospitalarias por SAMR, las cuales implicaron un millón de días extras de internación (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

Además de la elevación de los costos, estas infecciones aumentan la carga de enfermedad y la mortalidad. En 2005 se registraron 94.000 infecciones hospitalarias por SAMR en Estados Unidos, con más de 18.000 muertes (Klebens *et al.*, 2007).

Por lo tanto, se recomienda realizar cultivos de vigilancia para identificar pacientes colonizados por SAMR al momento del ingreso al hospital, de manera de instrumentar medidas de aislamiento e impedir la transmisión a otros pacientes. Se estima que el 85% de esos pacientes colonizados por SAMR no serían detectados por los cultivos realizados para diagnóstico. Además, un tercio de los pacientes colonizados desarrollarán una infección por SAMR durante o en los meses posteriores a su hospitalización, por lo que también se recomienda que sean “descolonizados” (Davis *et al.*, 2004). Esta doble estrategia de búsqueda y descolonización ha logrado reducir las tasas de infección por SAMR en algunos países como Reino Unido.

Sin embargo, una nueva amenaza surgió a partir de la década del noventa: SAMR-com. Estos aislamientos se diseminan más velozmente, dando lugar a epidemias de enormes proporciones, como las ocurridas en Estados Unidos y más recientemente en Uruguay. Son capaces de causar, en algunos casos, cuadros clínicos de inusitada gravedad y muerte, cuadros que no habían sido observados anteriormente, como la neumonía necrosante, en pacientes jóvenes sin factores de riesgo. SAMR-com posee atributos de virulencia específicos, como la leucocidina Pantón-Valentine.

2.2- *Staphylococcus aureus* y su relevancia clínica

2.2.1- Microorganismo

Staphylococcus aureus ssp. *aureus* pertenece al género *Staphylococcus* de la familia *Staphylococaceae*. Las bacterias pertenecientes a este género son cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, que se agrupan en racimos (Figura 1) y son cultivables en medios microbiológicos simples. Las colonias de *S. aureus* son usualmente grandes (diámetro mayor a 1 mm), circulares, levemente elevadas, lisas y generalmente con pigmentación amarilla.

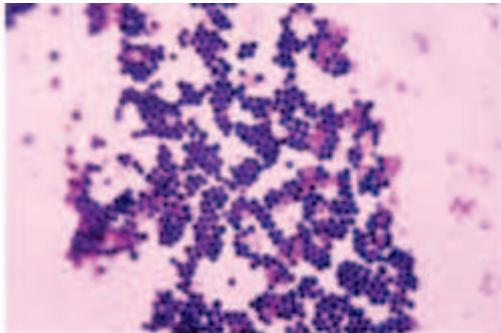


Figura 1. Tinción de Gram de *S. aureus*

S. aureus se caracteriza por ser un microorganismo anaerobio facultativo, no móvil, no formador de esporas y que se identifica por ser positivo para los ensayos de catalasa, coagulasa y ADNasa (estos dos últimos ensayos permiten diferenciarlo del resto de las especies del género *Staphylococcus*).

2.2.2- Relación huésped – microorganismo

En su relación con el hospedador, *S. aureus* puede formar parte de la microbiota normal o ser agente de infecciones, incluyendo procesos invasivos severos.

Ya en el año 1882, Ogston nombró a los cocos en racimos que observó en materiales purulentos de abscesos humanos, como *Staphylococcus* (del griego, “staphyle” racimos de uva) para diferenciarlos de los cocos en cadena del género *Streptococcus* (Ogston, 1882). Posteriormente, en 1884, Rosenbach aisló cepas pertenecientes al género, que nombró *Staphylococcus aureus* (del latín, “aurum” oro) por la pigmentación de sus colonias.

El principal nicho ecológico de *S. aureus* lo constituyen las narinas, pero el microorganismo puede ser aislado de otros sitios húmedos como axilas, vagina, recto o perineo. *S. aureus* coloniza aproximadamente al 30% de la población en general y más de 50% de diabéticos, usuarios de drogas intravenosas o personal de la salud (Archer, 1998). La portación asintomática constituye un reservorio para la infección del hospedador (Kluytmans *et al.*, 1997), así como también para la transmisión de persona a persona (Wertheim *et al.*, 2005). *S. aureus* no solamente coloniza y causa infección en humanos, sino también en algunos animales domésticos y de granja, los cuales también actúan como vehículos en la transmisión (Lowy, 2011).

El rango de huésped está condicionado por las vías que el microorganismo utiliza para la adquisición de hierro, a través de un receptor bacteriano que tiene mayor afinidad por la hemoglobina humana que por la de otros huéspedes. Esta característica puede transferirse horizontalmente y permite saltos interespecíficos (Pishchany *et al.*, 2010).

La piel y las mucosas sanas constituyen una barrera que previene la infección, sin embargo, si *S. aureus* penetra en los tejidos subcutáneos por un trauma en dicha barrera, es capaz de proliferar en esos tejidos blandos y también de causar una infección generalizada. Las personas inmunocoprometidas o aquellas con dispositivos terapéuticos invasivos como catéteres son particularmente vulnerables a la infección.

2.2.3- Factores de virulencia

S. aureus despliega un arsenal de factores de virulencia (Figura 2), estructurales y de secreción, los cuales juegan distintos roles en la patogenicidad.

Es importante destacar que no todas las cepas poseen los mismos factores de virulencia y muchas veces la presencia de éstos se encuentra asociada a un determinado tipo clonal (Peacock *et al.*, 2002).

Los distintos factores de virulencia pueden agruparse en componentes de pared celular, proteínas de superficie, enzimas y toxinas. Su expresión se encuentra regulada según la etapa de infección; así, en el establecimiento del proceso infeccioso, cuando *S. aureus* se encuentra en fase de crecimiento exponencial, se expresan los factores asociados a la adhesión y durante la infección se expresan enzimas y toxinas que permiten la invasión, la destrucción de los tejidos y la formación de metástasis en otros sitios del organismo. Las toxinas son producidas en la fase estacionaria (Gordon & Lowy, 2008).

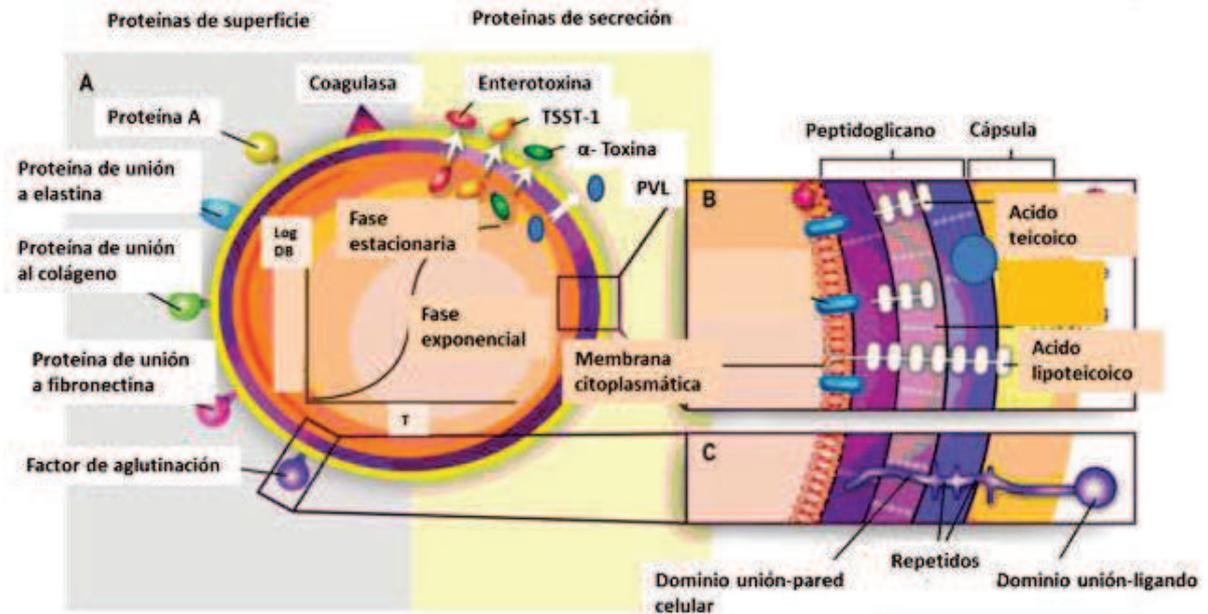


Figura 2. Factores de virulencia de *S. aureus*. A, proteínas de superficie y de secreción; B y C, secciones de la envoltura celular. Adaptado de Lowy (Lowy, 1998)

2.2.3.1- Componentes de pared celular

La pared celular está compuesta por una gruesa capa de **peptidoglicano** que mantiene la rigidez de la misma, estimula la quimiotaxis, induce la formación de anticuerpos opsonizantes y participa en la activación del complemento desencadenando la inflamación. Los **ácidos teicoicos** unidos al peptidoglicano o a la membrana citoplasmática, tienen función antifagocítica.

La presencia de **cápsula polisacáridica** es variable y se asocia a la evasión del sistema inmune del huésped por su acción antifagocítica (principalmente serotipos 5 y 8) (Gordon & Lowy, 2008).

2.2.3.2- Proteínas de superficie, MSCRAMMs (del inglés, “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”)

Estas proteínas median la adhesión a los tejidos del huésped. La **proteína A** se une a la porción Fc de inmunoglobulinas (IgG) y previene la opsonización (Gordon & Lowy, 2008).

Otras proteínas de superficie involucradas en la adhesión y agregación bacteriana son: la **proteína de unión al colágeno**, la **proteína de unión a la fibronectina** y el **factor de aglutinación (coagulasa ligada)** (Gordon & Lowy, 2008).

2.2.3.3- Enzimas

Proteasas, lipasas, nucleasas, fofolipasa C y hialuronidasa se encuentran asociadas a la invasión y destrucción de los tejidos (Gordon & Lowy, 2008).

La **coagulasa libre** al igual que el factor de aglutinación, participa en la agregación bacteriana con formación de coágulos.

2.2.3.4- Toxinas

Las **hemolisinas (α , β , γ y δ)** poseen acción citolítica sobre variedad de células (leucocitos, eritrocitos, fibroblastos) participando así en la destrucción de los tejidos del huésped.

Las **enterotoxinas (SEA a SEQ, no F)** están relacionadas con la intoxicación alimentaria (Gordon & Lowy, 2008).

Las **exfoliatinas A y B** causan lesión a la epidermis y son responsables del síndrome de la piel escaldada (Prevost *et al.*, 2003).

La **leucocidina Panton-Valentine** es una citotoxina que daña las membranas de los leucocitos, formando poros (también genera necrosis de piel), por la acción sinérgica de dos proteínas, designadas S y F (LukS-PV y LukF-PV, respectivamente). Todas las cepas PVL positivas, producen ambas proteínas S y F, así como también tres proteínas para la γ -hemolisina (HlgA, HlgB y HlgC) (Prevost *et al.*, 1994).

Las proteínas LukS-PV y LukF-PV son codificadas por dos genes (*lukS-PV* y *lukF-PV*, respectivamente), separados por una timina, que se cotranscriben, y están ubicados en un bacteriófago (Kaneko *et al.*, 1997, Prevost *et al.*, 1995b, Prevost *et al.*, 1995a).

La PVL ha sido detectada en menos del 5% de *S. aureus* aisladas de hospitales (Prevost *et al.*, 1995b). En contraste, ha sido detectada en 93% de cepas asociadas a forunculosis, 85% de cepas asociadas a neumonía necrosante adquirida en la comunidad, 55% de cepas asociadas a celulitis, 50% de cepas de abscesos cutáneos, 23% de cepas de osteomielitis y en 13% de panadizos. La PVL no ha sido identificada en cepas asociadas a endocarditis, mediastinitis, neumonía hospitalaria, infección urinaria ni al síndrome de shock tóxico (Lina *et al.*, 1999).

Los aislamientos de SAMR de origen comunitario comúnmente poseen los genes para PVL, raramente detectados en las cepas de SAMR hospitalarias (Vandenesch *et al.*, 2003, Naimi *et al.*, 2003).

La **toxina de síndrome de shock tóxico 1 (TSST-1)**, codificada por el gen cromosómico *tst*, está clínicamente asociada con el síndrome de shock tóxico (Prevost *et al.*, 2003, See & Chow, 1989). Primariamente se la denominó enterotoxina F porque está sintomáticamente relacionada a las enterotoxinas, pero existe poca homología de aminoácidos entre éstas (Blomster-Hautamaa *et al.*, 1986).

Tanto las enterotoxinas, como las exfoliatinas y la TSST-1 actúan como superantígenos activando directamente a los linfocitos T, provocando una “tormenta de citoquinas”, lo que puede conducir a un shock séptico (Gordon & Lowy, 2008).

2.2.4- Tipos de infección

S. aureus es agente causal de infecciones de piel y partes blandas; de procesos invasivos (acceso al torrente sanguíneo, formación de abscesos metastásicos, sepsis) y de infecciones mediadas por toxinas.

2.2.4.1- Infecciones de piel y partes blandas (IPPB): se trata de infecciones que afectan la epidermis y la dermis, así como también la grasa subcutánea, la fascia y el músculo. *S. aureus* es el agente causal más frecuente de IPPB (Dryden, 2010).

Impétigo: afecta la epidermis y consiste en una pequeña vesícula que luego se rompe con diseminación superficial, formándose una costra seca. El impétigo ampolloso se caracteriza por grandes ampollas en el sitio de infección, que derivan en zonas costrosas. Es una afección frecuente en niños (López & Sanders, 2004).

Foliculitis: afecta al folículo piloso y aparece con mayor frecuencia en axilas, cara, cuello y nalgas. Se trata de una infección menor, que se manifiesta como pápulas eritematosas con un componente pustuloso central (López & Sanders, 2004).

Forunculosis: consiste en pequeños abscesos que aparecen en la región del folículo piloso, que suelen recidivar y convertirse en una enfermedad recurrente. Se presenta como un nódulo inflamatorio doloroso que se extiende a la dermis. En general, los sujetos con forunculosis recurrente suelen ser portadores nasales.

El cuadro clínico se denomina **ántrax** cuando existe un grupo de forúnculos confluentes que segregan pus de múltiples fístulas, dolorosos y con fiebre. Otros **abscesos cutáneos**

diferentes de forúnculos y ántrax, son los nódulos eritematosos subcutáneos asociados a dolor y edema local (López & Sanders, 2004).

Celulitis: consiste en un proceso infeccioso inflamatorio agudo que afecta la parte más profunda de la dermis y la grasa subcutánea.

Infección de heridas: especialmente quirúrgicas o traumáticas (cortes, quemaduras).

Infección de piel debida a toxinas: en esta categoría se incluye el síndrome de la piel escaldada, producido por el pasaje de la toxina exfoliativa del foco de infección al torrente sanguíneo y luego a la piel, generando ampollas con la subsiguiente descamación de la epidermis.

2.2.4.2- Infecciones invasivas: si la bacteria vence las diferentes barreras de defensa del huésped y accede al torrente sanguíneo, puede producirse diseminación a otras regiones del cuerpo normalmente estériles, ocasionando cuadros invasivos como neumonía y endocarditis. La bacteriemia, definida como la presencia de bacterias viables en la sangre puede evolucionar a sepsis con falla multiorgánica.

2.2.4.3- Infecciones mediadas por toxinas:

El **síndrome de shock tóxico** es un cuadro clínico caracterizado por fiebre, hipotensión, exantema cutáneo en manos y pies y falla renal. El mismo puede evolucionar al shock séptico en 48 horas.

Las **intoxicaciones alimentarias** son producidas por cepas productoras de enterotoxinas termoestables, las cuales generan un cuadro transitorio de intoxicación con diarrea y vómitos.

2.2.5- Genoma

El genoma de *S. aureus* posee un tamaño aproximado de 2.9 Mb con aproximadamente 7% constituido por elementos genéticos móviles como transposones, islas genómicas

(patogenicidad, resistencia), plásmidos y profagos, los cuales codifican, entre otros, determinantes de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia.

En 2001 Kuroda y cols. secuenciaron el genoma de dos cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de origen hospitalario, N315 y Mu50 (aisladas en 1982 y 1997, respectivamente). Ambas cepas poseen un casete cromosómico denominado SCCmec (del inglés, “*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*”) tipo II, que contiene el gen *mecA* de resistencia a meticilina, junto con genes de resistencia a otras familias de antibióticos. También se identificaron genes de resistencia en plásmidos o en otros elementos genéticos móviles. Ambas cepas poseen tres islas de patogenicidad, que codifican para la toxina de shock tóxico, enterotoxinas y exotoxinas (Kuroda *et al.*, 2001).

En 2002, Baba y cols. publicaron la secuencia completa del genoma de una cepa de *S. aureus* meticilino resistente adquirida en la comunidad, MW2, causante de septicemia fatal y artritis séptica, que fue aislada en Dakota en 1998. MW2 presentaba una nueva forma de SCCmec que fue identificada como tipo IVa. El SCCmec tipo IVa no posee ningún otro gen de resistencia a antibióticos aparte de *mecA*. La PVL fue localizada en un segmento fágico, además de 19 genes adicionales de virulencia organizados en islas genómicas (Baba *et al.*, 2002).

Otro genoma secuenciado fue el de SAMS476, una cepa de *S. aureus* adquirida en la comunidad, perteneciente al principal clon asociado con enfermedad de origen comunitario que también contiene a MW2. SAMS476 es resistente a penicilina (genes que codifican β -lactamasas) y ácido fusídico, pero susceptible a meticilina. Contiene un elemento SCC₄₇₆ similar tanto en estructura como en localización a SCCmec pero carente del gen *mecA*, aunque posee un gen de resistencia al ácido fusídico. También carece de la PVL presente en MW2 (Holden *et al.*, 2004).

En 2006 se publicó el genoma completo de una cepa de SAMR denominada USA300, agente de infecciones adquiridas en la comunidad en Estados Unidos, Canadá y Europa. Contiene diferentes elementos genéticos móviles: el SCCmec tipo IV con *mecA* y un gen de resistencia a ciprofloxacina; la isla genómica ACME (del inglés, “Arginine Catabolic Mobile Element”); islas de patogenicidad codificantes de enterotoxinas; profagos (entre ellos el que codifica la PVL) y plásmidos de resistencia a otros antibióticos (Diep *et al.*, 2006).

Se destaca la habilidad de *S. aureus* para adquirir genes por transferencia horizontal; estos elementos genéticos móviles que codifican determinantes de resistencia y de virulencia le

confieren ventajas selectivas en la adaptación a su huésped (Kuroda *et al.*, 2001, Diep *et al.*, 2006).

2.3- Resistencia a los antibióticos

S. aureus es naturalmente susceptible a los antibióticos y la resistencia ha sido adquirida generalmente por transferencia horizontal de genes desde una fuente externa a la especie. Fue contra este microorganismo, por su susceptibilidad natural a la penicilina, que Alexander Fleming desarrolló sus primeros ensayos inaugurando así la era antibiótica.

2.3.1- Resistencia a β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos inhiben la síntesis de pared celular por su unión a las proteínas PBPs (del inglés, “Penicillin Binding Proteins”), las cuales participan en las etapas finales de la síntesis del peptidoglicano.

2.3.1.1- Resistencia a penicilina

La resistencia a penicilina se debe a la producción de una penicilinasas plasmídica (gen *blaZ*), la cual hidroliza el anillo β -lactámico. La penicilinasas no hidroliza a las penicilinas semisintéticas, ni a las cefalosporinas, ni a los carbapenems.

Inmediatamente después de la introducción de la penicilina en 1941, se reportaron cepas de *S. aureus* resistentes en los hospitales (1942), y una década más tarde fueron aisladas en la comunidad (Chambers & Deleo, 2009). Actualmente más del 95% de las cepas de *S. aureus* son productoras de penicilinasas por lo cual la penicilina se ha dejado de utilizar para el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo.

2.3.1.2- Resistencia a meticilina

La meticilina fue introducida en 1960 para el tratamiento de infecciones causadas por cepas resistentes a penicilina. Ya en 1961 se reportaron las primeras cepas resistentes en los hospitales; pero esta vez tardarían 3 décadas en aparecer cepas resistentes en la comunidad (Chambers & Deleo, 2009).

La resistencia a meticilina y a todos los β -lactámicos, está determinada por la presencia del gen *mecA*, el cual codifica para una PBP alternativa, la PBP2a de baja afinidad por estos antibióticos (Hartman & Tomasz, 1981, Archer *et al.*, 1994).

La PBP2a cataliza la formación de la pared cuando las otras PBPs resultan inactivadas por los β -lactámicos. El gen *mecA*, altamente conservado, está localizado en el elemento genético móvil variable SCC*mec* (Ito *et al.*, 1999, Katayama *et al.*, 2000).

Las cepas portadoras del gen *mecA* pueden presentar el fenotipo homotípico, en el cual toda la población presenta altos niveles de resistencia; o heterotípico donde solamente un pequeño porcentaje de la población presenta resistencia a concentraciones mayores a 10 $\mu\text{g/mL}$. Estos fenotipos pueden detectarse utilizando el disco de oxacilina. La heteroresistencia se manifiesta como un doble halo o por la presencia de colonias dispersadas uniformemente dentro del halo de inhibición producido por la población sensible al antibiótico.

El SCC*mec* está compuesto por el complejo *ccr*, el cual codifica recombinasas; y por el complejo *mec* que porta el gen *mecA*. Puede contener también genes de resistencia a otros antibióticos no β -lactámicos en transposones o en copias integradas de plásmidos (Katayama *et al.*, 2000). Los segmentos adyacentes a los complejos *ccr* y *mec* se denominan regiones J (J1-J3).

Los distintos tipos de SCC*mec* se definen según la combinación del tipo de complejo *ccr* y del tipo de complejo *mec* y han sido nombrados sucesivamente (a medida que han sido identificados) con números romanos. También se han definido subtipos de SCC*mec* por las variaciones en la estructura de la región J; por ejemplo SCC*mec* tipo IV ha sido subdividido en IVa, IVb, IVc y IVd basado en diferencias en la región J1 (Hanssen & Ericson, 2006).

El complejo *ccr*, cuya función es la integración del SCC*mec* al genoma bacteriano, posee en la mayoría de los casos, dos genes adyacentes, *ccrA* y *ccrB* para recombinasas sitio específico, o el gen *ccrC* (Chambers & Deleo, 2009). En función de las variantes que presentan estos genes, los complejos *ccr* son designados *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* y *ccrC*.

El complejo *mec* posee el gen *mecA*, elementos regulatorios (*mecR1* y *mecI* o Δ *mecR1*) y secuencias de inserción (*IS431*, *IS1272*). Han sido identificadas 5 clases (A-E) de complejo *mec*, con diferencias en la composición de los elementos regulatorios y las IS (Katayama *et al.*, 2001) (Figura 3).

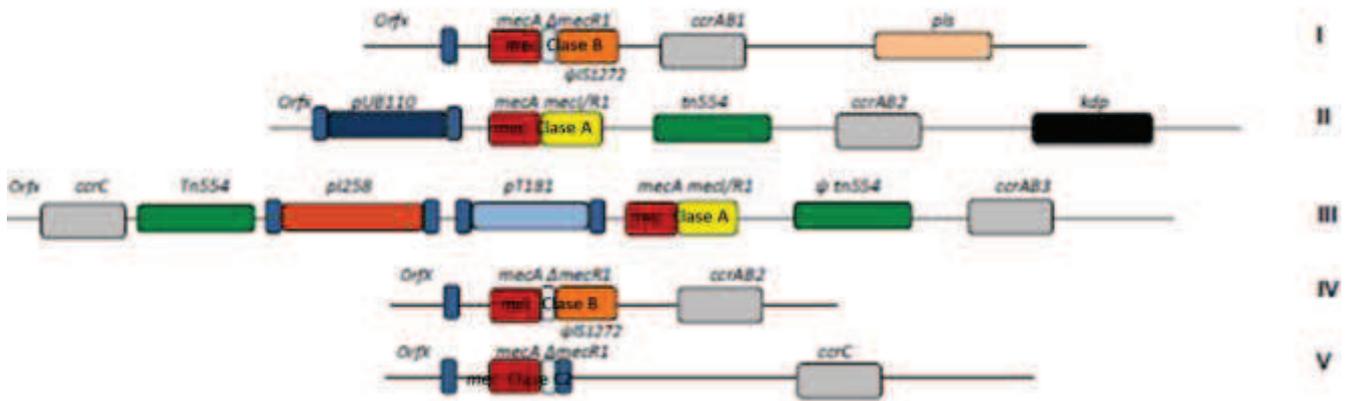


Figura 3. Representación esquemática de los SCCmec tipos I a V. Adaptada de Deurenberg (Deurenberg & Stobbering, 2008).

Hasta el momento se han identificado 11 tipos de SCCmec (Ito *et al.*, 2014).

La tabla 1 muestra la composición de *ccr* y complejo *mec* de los SCCmec tipo I al VIII y sus respectivos tamaños.

Tabla 1. Composición de los SCCmec tipo I a VIII

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
COMPLEJO <i>mec</i>	B	A	A	B	C2	B	C1/C2	A
COMPLEJO <i>ccr</i>	AB1	AB2	AB3	AB2	C	AB4	C2 y C8	AB4
TAMAÑO (kb)	34	53	67	21-24	28	24	41-49	32

(Chambers & Deleo, 2009)

El gen *mecA* ha sido identificado en varias especies del género *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) conservando más de 98% de homología (Tsubakishita *et al.*, 2010). Sin embargo, ocasionalmente se han identificado genes similares a *mecA* cada vez más divergentes, entre ellos, una variante denominada *mecC*. Este gen presenta solamente 62% de homología con *mecA* y fue descubierto en Europa, en cepas de *S. aureus* con SCCmec tipo XI asociadas a fallas en el tratamiento (Shore *et al.*, 2011). Esta variante resistente puede no ser detectada por los ensayos de sensibilidad comerciales y de detección de *mecA* convencionales, por lo que se hace necesario implementar nuevos métodos para su detección (Laurent *et al.*, 2012).

Otro mecanismo de resistencia a meticilina, no asociado al gen *mecA*, debido a una hiperproducción de penicilinasa como resultado de mutaciones en el sistema de regulación, se encuentra a muy baja frecuencia y no ha sido identificado en nuestro país.

2.3.2- Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B

El mecanismo de acción de estos antibióticos es por inhibición de la síntesis proteica al unirse al ribosoma.

Uno de los fenotipos de resistencia observados es el que expresa resistencia a macrólidos

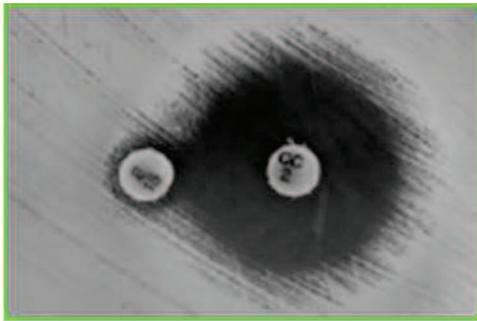


Figura 4. Prueba de disco difusión de eritromicina (E) y clindamicina (CC). Fenotipo de resistencia MS_B (Steward *et al.*, 2005)

(eritromicina) y estreptogramina B pero no a clindamicina, denominado fenotipo MS_B . Este mecanismo es mediado por el gen *msrA* que codifica para un sistema de eflujo, capaz de bombear al antibiótico fuera de la célula. En la prueba de disco difusión este fenotipo se evidencia como muestra la figura 4.

Otro fenotipo es el que confiere resistencia a macrólidos, lincosamidas (clindamicina) y estreptogramina B, denominado MLS_B ; debido a la presencia de una metilasa (codificada por genes *erm*) que modifica el ARNr 23S e inhibe la unión de cualquiera de estas 3 familias de antibióticos.

El fenotipo MLS_B puede ser constitutivo ($cMLS_B$), por expresión continua de la metilasa o inducible ($iMLS_B$) cuando se expresa *in vitro* en presencia de un macrólido como eritromicina. En la prueba de disco difusión se puede detectar la variedad de fenotipos de resistencia, colocando los discos de eritromicina y clindamicina, a una distancia de 15-26 mm de borde a borde (Prueba de inducción). El fenotipo inducible se manifiesta como un achatamiento del halo de inhibición de clindamicina, en forma de “D”.

Los dos fenotipos de inducción se denominan D y D+, y los constitutivos R y HD (Figura 5), dependiendo de si presentan un comportamiento homotípico o heterotípico, en cada caso respectivamente.

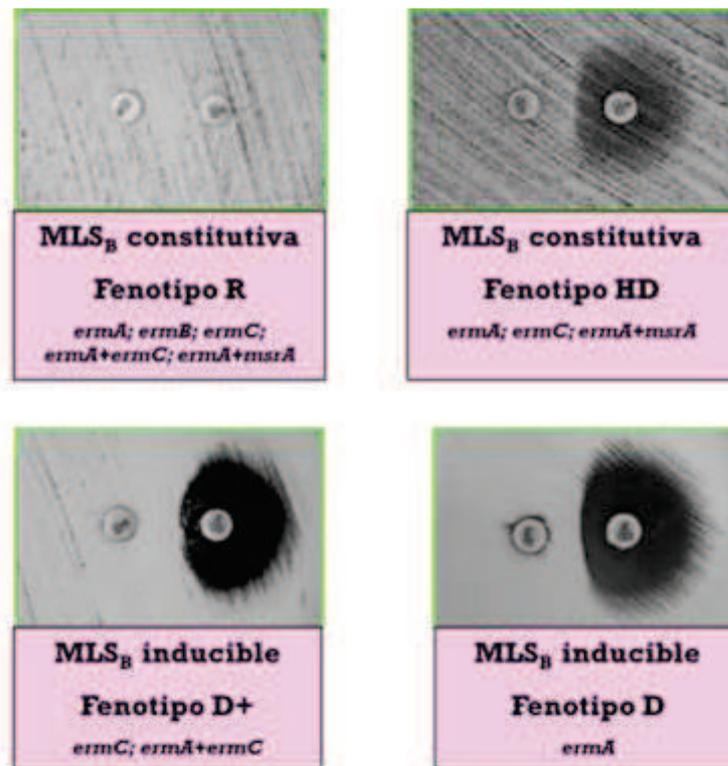


Figura 5. Prueba de disco difusión. Fenotipos MLS_B y sus genotipos asociados. Adaptado de Steward (Steward *et al.*, 2005).

2.3.3- Resistencia a glicopéptidos

Los glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina) inhiben la síntesis de la pared celular al unirse al pentapéptido naciente por su terminal D-Ala-D-Ala.

La vancomicina es la terapia de elección en pacientes con cuadros severos por *S. aureus*, por la alta prevalencia de cepas hospitalarias multiresistentes.

Un aislamiento se define resistente a vancomicina y se denomina VRSA (del inglés, “Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*”) cuando posee una concentración inhibitoria mínima (CIM) mayor o igual a 16 µg/mL. Si el aislamiento posee una CIM entre 4-8 µg/mL se define como de sensibilidad disminuida o intermedia y se nombra VISA (del inglés, “Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*”). Se define como sensible a vancomicina y se denomina VSSA (del inglés, “Vancomycin Sensible *Staphylococcus aureus*”) cuando posee una CIM menor o igual a 2 µg/mL.

El mecanismo de resistencia alta a vancomicina se debe a la presencia del locus *vanA*, que se había diseminado previamente en cepas de *Enterococcus faecalis*. Este locus contiene

genes que codifican para enzimas que sintetizan D-Ala-D-Lac en lugar de D-Ala-D-Ala, terminal del pentapéptido que no es reconocida por el antibiótico.

El fenotipo heteroresistente de VISA (hVISA) presenta una CIM a vancomicina clasificada como susceptible, pero contiene subpoblaciones que pueden crecer a concentraciones mayores, lo que hace necesario implementar nuevos métodos para su detección.

Las cepas hVISA no presentan el locus *vanA* y se desconoce el mecanismo de resistencia exacto, pero se ha hipotetizado sobre un mecanismo de “trampas de afinidad” donde la vancomicina se uniría a “blancos falsos” en la pared celular en lugar de a la terminal D-Ala-D-Ala del pentapéptido (Sieradzki *et al*, 1999). Fenotípicamente, las cepas VISA y hVISA se diferencian de las cepas sensibles por crecer más lentamente y presentar variaciones de tamaño y de pigmentación de las colonias en cultivo.

El método de referencia para identificar hVISA es el análisis poblacional “PAP- AUC” (del inglés, “Population Analysis Profile- Area Under Curve”) pero existen varios métodos de tamizaje más accesibles para laboratorios de diagnóstico. Uno de estos es el macrométodo epsilométrico, el cual se basa en tiras de plástico con un gradiente del antibiótico. Normalmente se utiliza para determinar la CIM pero en este caso, utilizando un inóculo mayor y un tiempo más prolongado de incubación, permite identificar estos aislamientos con susceptibilidad disminuida a vancomicina.

2.4- Evolución de la resistencia en *S. aureus*

Desde el inicio de la era antibiótica, *S. aureus* ha ido adquiriendo genes de resistencia, pero el mayor impacto clínico corresponde a los sucesivos pasos de adquisición de resistencia a β -lactámicos que, según Chambers, podrían equipararse a “ondas de resistencia” (Figura 6) (Chambers & Deleo, 2009). La primera se evidencia luego de la introducción de la penicilina, con la aparición de cepas resistentes al antibiótico. La segunda, luego de la introducción de la meticilina con el aislamiento de la primera cepa SAMR, que contenía el gen *mecA* en un casete *SCCmec* de tipo I. La tercera onda corresponde a la emergencia de cepas de SAMR con *SCCmec* tipos II y III, que incorporaron resistencia a otras familias de antibióticos y se distribuyeron ampliamente en los hospitales. La cuarta onda comenzó con la emergencia de SAMR en la comunidad, cepas sensibles a la mayoría de los antibióticos no β -lactámicos, con *SCCmec* tipo IV y PVL.

El segundo mecanismo de resistencia en importancia clínica corresponde a los glicopéptidos, en especial vancomicina, ya que en muchos casos era la única opción de tratamiento de *S. aureus* multiresistentes.

La vancomicina fue introducida en el año 1958 y recién en 1995 se reportó en Francia el primer aislamiento VISA (Ploy *et al.*, 1998). En 1996 y 1997 se reportaron los primeros casos en Japón y en Estados Unidos, respectivamente. En el año 2002 se documentaron dos casos de VRSA en Estados Unidos (Minnesota Department of Health, 2004).

En America Latina no habían sido reportados casos de VRSA hasta marzo del año 2013 cuando en el marco del “XIII Workshop de Resistencia Bacteriana” se notificó el primer aislamiento de una cepa VRSA en Brasil, que fue aislada de bacteriemia, en un paciente tratado con glicopéptidos y colonizado por *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*); esta cepa posee el gen *vanA* y pertenece a un clon comunitario (Rossi & Arias, 2013).

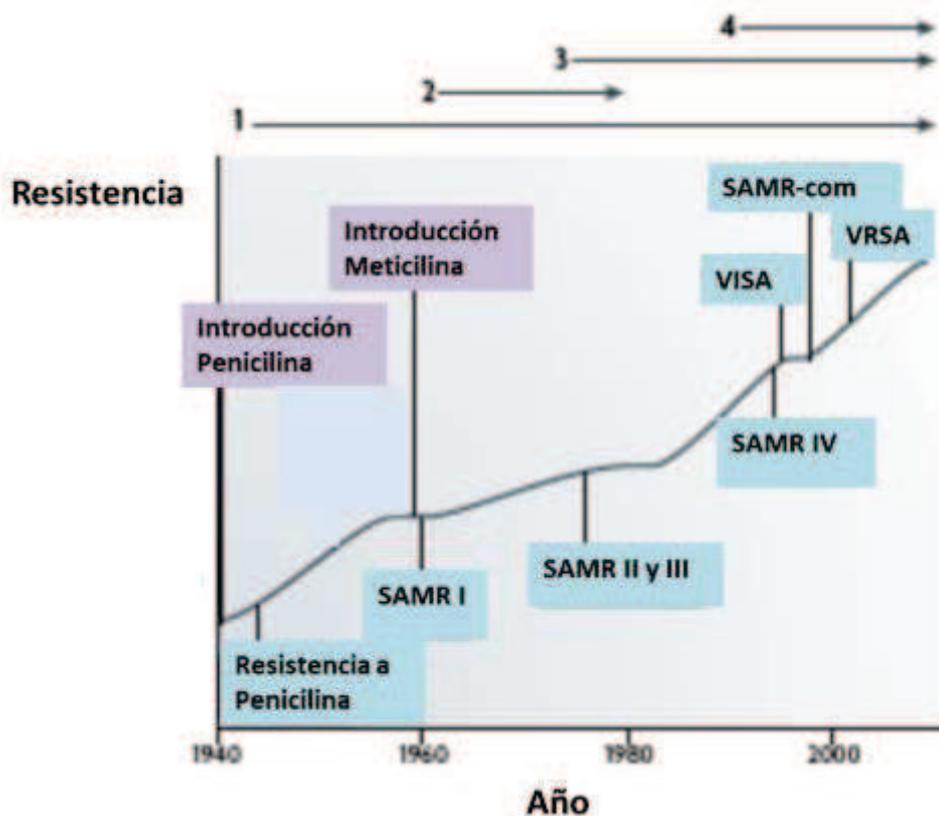


Figura 6. Evolución de la resistencia en *S. aureus*. Adaptado de Chambers (Chambers & Deleo, 2009)

La Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a Antimicrobianos en Uruguay reportó porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en aislamientos de *S. aureus* hospitalarios (Tabla 2). Entre 2003 y 2005 las cepas SAMR hospitalarias representaban

aproximadamente el 50% de los aislamientos de *S. aureus*. Entre 2006 y 2008 se observó una tendencia decreciente, que en 2008 alcanzó el 30%. Generalmente, las cepas SAMR presentaban también resistencia a eritromicina y clindamicina y en menor medida a ciprofloxacina y gentamicina. Los porcentajes de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol y rifampicina eran bajos y no se detectaba resistencia a vancomicina (OPS, 2003-2008). La resistencia a meticilina se detectó mediante el uso de los discos de oxacilina y cefoxitin; la oxacilina resulta más estable que la meticilina en las pruebas *in vitro* y el cefoxitin promueve un mayor nivel de expresión de *mecA*.

Tabla 2. Porcentajes de resistencia en cepas de *S. aureus*. Uruguay (2003-2008)

AÑO / n	OXA % R	FOX % R	ERI % R	CLI % R	CIP % R	SXT % R	GEN % R	VAN % R	RIF % R
2003/220	47		55	29	27	17	25	0	
2004/1431	62		44	17	16	7	14	0	6
2005/741	56	54	43	25	24	12	21	0	
2006/327	41	38	33	28	21	4	11	0	
2007/300	39	38	41	36	24	5	14	0	4
2008/172	30	30	21	20	19	6	20	0	0

OXA: oxacilina; FOX: cefoxitin; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; CIP: ciprofloxacina; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; GEN: gentamicina; VAN: vancomicina; RIF: rifampicina. Se incluyó la categoría de sensibilidad intermedia en la de resistencia (OPS, 2003-2008).

2.4.1- *Staphylococcus aureus* meticilino resistente: origen y evolución

SAMR se aisló por primera vez en Inglaterra en 1961, un año después que la meticilina se había incorporado al tratamiento y desde 1970 se ha convertido en una de las principales causas de infecciones nosocomiales en todo el mundo.

La evidencia sugiere que SAMR ha surgido debido a eventos de transferencia horizontal entre especies del género *Staphylococcus*. En *Staphylococcus sciuri* se identificó un gen *mecA* homólogo al de *S. aureus*. Si bien esta cepa era naturalmente susceptible a los β -lactámicos, los mutantes generados en presencia de altas concentraciones de meticilina mostraban un aumento drástico en la tasa de transcripción de *mecA* (mutación puntual del

promotor). Además se comprobó que este gen introducido en una cepa de *S. aureus* meticilino sensible revertía el fenotipo a resistente (Wu *et al.*, 2001).

Otra evidencia de transferencia horizontal dentro del género *Staphylococcus* fue el hallazgo de una cepa de SAMR que contenía un gen *mecA* idéntico al que presentaba un *Staphylococcus epidermidis* del mismo paciente (Wielders *et al.*, 2001).

Algunas secuencias presentes en los *SCCmec* de SAMR también han sido detectadas en otras especies del género, como la *IS1272* de los tipos I y IV en *Staphylococcus haemolyticus*.

Si bien el gen *mecA* posee una secuencia altamente conservada, la diversidad de *SCCmec* evidencia que los distintos linajes serían el resultado de múltiples eventos de introducción del gen *mecA* en linajes exitosos de SAMS (Enright *et al.*, 2002). Primariamente se postulaba que todas las cepas de SAMR habían evolucionado de un ancestro único que había adquirido *mecA* en un solo evento (Kreiwirth *et al.*, 1993).

2.4.2- Métodos de estudio

Entre las técnicas utilizadas para comprender el origen y la diversidad de los distintos clones de SAMR, se destacan la electroforesis en campos pulsados (PFGE, del inglés, “Pulsed Field Gel Electrophoresis”), la tipificación de secuencias multilocus (MLST, del inglés, “Multilocus Sequence Typing”) y la tipificación de *SCCmec*.

El criterio para considerar a determinados aislamientos de SAMR como pertenecientes a un mismo clon es que compartan un mismo secuenciotipo (ST, del inglés, “Sequence Type”) y el mismo tipo *SCCmec* (Enright *et al.*, 2002).

La PFGE posee un alto poder discriminatorio para análisis epidemiológicos locales ya que detecta pequeñas variaciones generadas en períodos relativamente cortos de tiempo. Estudia los polimorfismos electroforéticos de fragmentos de ADN del genoma completo, generados por una enzima de restricción de corte poco frecuente, como *SmaI*. Este método requiere una estricta estandarización de protocolos y sistematización de la nomenclatura para poder comparar los resultados. Resulta menos apropiado para el estudio de la historia evolutiva de los clones a nivel mundial (Aires de Sousa & de Lencastre, 2004).

El MLST se basa en la secuenciación de 7 fragmentos de genes que codifican para enzimas metabólicas esenciales. Cada aislamiento es definido por los alelos de los 7 genes que configuran un perfil alélico o secuenciotipo. Un complejo clonal (CC) está compuesto por ST que comparten al menos 5 de los 7 alelos con al menos uno de los integrantes del CC.

Esta técnica es adecuada para estudios del origen y evolución de los clones y los resultados generados se depositan en una base de datos internacional de libre acceso (Deurenberg *et al.*, 2007).

La tipificación de SCC*mec* ha sido implementada por diversos protocolos, los dos más utilizados son la PCR múltiple de Oliveira y cols., que detecta el gen *mecA* y diversos loci en los SCC*mec* del I al IV y la PCR desarrollada por Ito y cols. que detecta la presencia de diferentes *ccr* y determina la estructura del complejo *mec* (Oliveira & de Lencastre, 2002, Ito *et al.*, 2001).

2.4.3- *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de origen hospitalario

La primera cepa de SAMR aislada en 1961 pertenecía al clon arcaico. Desde entonces las infecciones por SAMR-hosp han sido ocasionadas por un número limitado de clones que se han diseminado internacionalmente. Los principales clones epidémicos causantes de infecciones a nivel hospitalario (Tabla 3) se denominan en su mayoría según el lugar donde han sido descritos inicialmente, aunque luego se hayan expandido a nivel mundial (Figura 7).

Tabla 3. Principales clones epidémicos de SAMR-hosp.

NOMBRE DEL CLON	CC	ST	SCC<i>mec</i>
Brasilero	8	239	III
Arcaico	8	250	I
Ibérico	8	247	I
Pediátrico	5	5	IV
New York/Japón, USA100	5	5	II
EMRSA-16, USA200	30	36	II
Berlín, USA600	45	45	IV
EMRSA-15	22	22	IV

CC: complejo clonal; ST: secuenciotipo
Adaptada de Deurenberg (Deurenberg *et al.*, 2007)



Figura 7. Esquema de distribución de seis clones epidémicos de SAMR-hosp (Aires de Sousa & de Lencastre, 2004).

Más recientemente han surgido nuevos clones que han ido reemplazando a los anteriores, éstos se caracterizan por poseer resistencia a menos antibióticos, como el caso del clon cordobés (ST5, SCCmec I) (Sola *et al.*, 2002) y de EMRSA-15 y 16.

2.4.4- *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de origen comunitario

A partir de la década del '80 aparecieron algunos reportes puntuales de casos de infecciones por SAMR en la comunidad, afectando a individuos inmunocomprometidos, diabéticos y usuarios de jeringas (Bannerman, 2003). Es decir, no correspondían estrictamente a la definición de “comunitario” ya que las personas afectadas constituían grupos de riesgo, probablemente sometidos a tratamientos y/o internados recientemente.

El primer reporte a nivel mundial de *S. aureus* meticilino resistente estrictamente de origen comunitario fue en comunidades aborígenes de Australia en 1993 (Udo *et al.*, 1993). Estas cepas fueron aisladas de infecciones de piel y partes blandas en individuos que no poseían factores de riesgo. Desde entonces diversos clones se han expandido a nivel regional y/o mundial.

Desde la aparición de *S. aureus* en la comunidad han ido surgiendo diversas definiciones, de manera de diferenciar conceptualmente SAMR-com de SAMR-hosp.

El CDC define una infección de origen comunitario por SAMR como aquella en la cual se obtiene un cultivo positivo del microorganismo dentro de las 48 horas de la admisión del paciente o si se evidenció una infección al momento de ingresar. Además el paciente no debe haber sido vinculado al ámbito hospitalario en el último año (cirugías, diálisis, residencia por períodos prolongados, uso de catéteres o sondas), ni tener antecedente de una infección anterior por SAMR, ni portación (Gorwitz *et al.*, 2006).

Un cultivo positivo después de las 48 horas de la admisión si el paciente no presentaba signos de infección al ingresar, así como infección en pacientes que han estado internados en el último año, define clásicamente a una infección de origen hospitalario.

Sin embargo, existen algunas limitaciones para aplicar estas definiciones. Por un lado se ha observado que el estado de portador asintomático puede persistir durante meses y que la mayor parte de los pacientes colonizados desarrollan una infección por SAMR *a posteriori* del alta hospitalaria. Por otro lado, se ha comprobado que la permanencia en asilos de ancianos o casas de salud constituye un riesgo alto, similar al de la hospitalización. Por lo tanto, las definiciones actuales de infección hospitalaria o comunitaria se basan más en factores de riesgo y requieren un cuestionario bastante exhaustivo para arribar a una conclusión.

Una limitación adicional al uso de las definiciones clásicas es que SAMR-com ha comenzado a propagarse también en los hospitales en los países donde la prevalencia de SAMR-com es elevada como en Estados Unidos, infectando a los pacientes que tradicionalmente se infectaban por SAMR-hosp (Klevens *et al.*, 2006).

Otro criterio que podría utilizarse es el microbiológico, ya que SAMR-com es fenotípica y genotípicamente diferente de SAMR-hosp, generalmente susceptible a la mayoría de los antibióticos no β -lactámicos, aunque también han aparecido algunas cepas resistentes. Entre los aislamientos de SAMR-hosp a su vez, han surgido cepas con un perfil de mayor sensibilidad que las que predominaban en décadas pasadas. Por lo tanto, una diferenciación basada en la sensibilidad a los antibióticos no β -lactámicos, sólo sería aplicable a las cepas completamente sensibles o completamente resistentes.

La mejor opción para la diferenciación entre cepas de SAMR-com y SAMR-hosp es basarse en marcadores moleculares. Así, se ha demostrado mediante PFGE y MLST que SAMR-com y SAMR-hosp son genéticamente diferentes y no comparten secuenciotipos (Tablas 3 y 4) (Groom *et al.*, 2001, Naimi *et al.*, 2001).

La mayoría de los aislamientos de SAMR-com poseen los casetes *SCCmec* tipo IV, V o VII (Deurenberg & Stobberingh, 2008).

Tristán y cols. postularon que la asociación entre la presencia de PVL y *SCCmec* tipo IV o V podía ser utilizada como marcador genético de SAMR-com (Tristan *et al.*, 2007). Sin embargo, existen estudios que describen cepas SAMR-com PVL negativas con *SCCmec* tipo IV (Kim *et al.*, 2007).

Respecto al origen de SAMR-com, la hipótesis con mayor consenso propone que el *SCCmec* ha sido adquirido por cepas meticilino sensibles en la comunidad (Okuma *et al.*, 2002).

En el caso de Australia, Robinson y cols. plantean que los aislamientos de SAMR-com y SAMR-hosp de ese país comparten un ancestro común, el clon originariamente meticilino-sensible ST30, PVL positivo. Este clon habría adquirido el *SCCmec* tipo IV y se habría constituido en el principal clon de SAMR-com en ese país. Por otro lado habría adquirido *SCCmec* tipo II y se habría convertido en el clon pandémico hospitalario EMRSA-16 (Robinson *et al.*, 2005).

Se han identificado cinco clones principales de SAMR-com PVL positivos que se han diseminado mundialmente (Tabla 4).

Tabla 4. Principales clones epidémicos de SAMR-com.

NOMBRE DEL CLON	CC	ST	SCCmec
Europeo	80	80	IV
Suroeste del Pacífico, USA1100	30	30	IV
USA400	1	1	IV
USA300	8	8	IV
USA1000	59	59	IV o VII

CC, complejo clonal; ST, secuenciotipo

Adaptada de Deurenberg (Deurenberg & Stobberingh, 2008).

El *SCCmec* tipo V, que también ha sido observado en linajes de SAMR-com se asocia a ST8, 59 y 45 (Deurenberg & Stobberingh, 2008).

2.4.5- Antecedentes nacionales de SAMR-hosp



Figura 8. Pulsotipos del clon brasileiro. Línea señalada: cepas representativas de Uruguay (Aires de Sousa *et al.*, 2001).

En el período 1996-1998, nuestro laboratorio participó de un estudio cooperativo realizado en 5 países latinoamericanos para caracterizar genótipicamente cepas de SAMR-hosp. Se identificó al clon brasileiro (o clon sudamericano), uno de los clones internacionales, como el principal causante de infecciones intrahospitalarias en esos 5 países: 79% de 494 aislamientos de SAMR-hosp compartían el mismo perfil de PFGE que el clon brasileiro (Figura 8). Mientras que en Argentina, Brasil, Chile y México también se aislaron otros clones (incluso algunos no descritos anteriormente), en Uruguay la totalidad de las cepas estudiadas en ese período pertenecían al clon brasileiro (Aires de Sousa *et al.*, 2001).

2.4.6- Antecedentes nacionales de SAMR-com

Tabla 5. SAMR-com en Servicio de Infecto-Contagiosos, Hospital Pereira Rossell.

	SAMR	SAMS	TOTAL
2001	1 (3.8%)	25	26
2002	3 (9.1 %)	30	33
2003	33 (35.5%)	60	93
feb-04	10 (47.6%)	11	21
Total	47 (27.2%)	126	173

(Galiana, 2003)

El primer caso de *S. aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad se reportó en Uruguay en 2001 en el Servicio de Infecto-Contagiosos del Hospital Pereira Rosell (Galiana, 2003). En los años siguientes la situación en ese servicio fue evolucionando hacia un aumento progresivo en el número de casos registrados (Tabla 5).

Durante el período Mayo-Noviembre de 2003 se documentó un brote de SAMR-com en cárceles del país que se inició como brote de escabiosis. Se constataron 890 infecciones de piel y partes blandas en una población carcelaria de 4250 presos. Se realizaron 58 cultivos de los cuales 40 (69%) eran SAMR. Los 40 SAMR eran susceptibles a otros antibióticos,

excepto eritromicina (93% de resistencia) y clindamicina (77% resistencia inducible) (Mowszowicz *et al.*, 2004). Probablemente este brote epidémico haya sido el elemento desencadenante para una epidemia entre la población en general.

En 2003 se documentaron en el país, cuadros sépticos severos de origen diverso y fundamentalmente neumonías necrosantes graves y rápidamente mortales (Tabla 6) o hiperagudas, en pacientes jóvenes sin factores de riesgo (Galiana *et al.*, 2004).

Tabla 6. Seis casos fatales de SAMR-com en Uruguay.

	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	CASO 6
EDAD	16	16	45	20	15	37
ANTECEDENTES	Piodermitis facial	No	Piodermitis	No	Celulitis post-picadura	Forúnculo
SINDROME	Neumonía necrosante	Neumonía necrosante	Neumonía necrosante	Sepsis	Sepsis	Neumonía necrosante
MUERTE	<24 horas	<48 horas	Día 45	Día 8	<24 horas	<48 horas

(Galiana *et al.*, 2004)

Durante el primer semestre de 2004 el tema cobró carácter público, debido sobre todo a la repercusión de los casos fatales, llegando a afectar la estructura sanitaria y política del país dentro de la cual se dirimían competencias y responsabilidades.

También a partir de 2004 se reglamentó la obligatoriedad de las denuncias de todas las infecciones por SAMR-com. Posteriormente, considerando el alto número de casos se decidió denunciar únicamente las infecciones invasoras y actualmente no son de denuncia obligatoria (Departamento de Laboratorios de Salud Pública, 2013).

La mayor incidencia de infecciones por SAMR-com se observó en los departamentos del sur del país. El porcentaje de SAMR-com en muestras de *S. aureus* de policlínica y emergencia en 2004 fue: en Montevideo, 62% niños y 72% adultos; en Maldonado, 61%; en Colonia, 58%; en Paysandú, 57%; en Salto, 29% y en Tacuarembó, 4% (Camou, 2004). Estos datos refuerzan la hipótesis de que el brote de SAMR-com tuvo su origen en Montevideo y desde allí se extendió a los otros departamentos. Entre 2005 y 2008 hubo una disminución de la morbi-mortalidad (Camou, 2004).

Un estudio de SAMR-com en Uruguay (2002-2003) indicaba que estas cepas pertenecían mayoritariamente a un único clon que poseía PVL, SCCmec tipo IVc, pulsotipo A y ST30. Las cepas pertenecientes a este clon presentaron similitud con las cepas del clon circulante en Australia (Ma *et al.*, 2005).

Otro estudio de las cepas responsables de esta epidemia nacional concluyó que el 92% de las cepas estudiadas de SAMR-com poseían SCCmec tipo IVc, PVL y perfiles de PFGE del tipo USA1100 (Benoit *et al.*, 2008) (Figura 9).

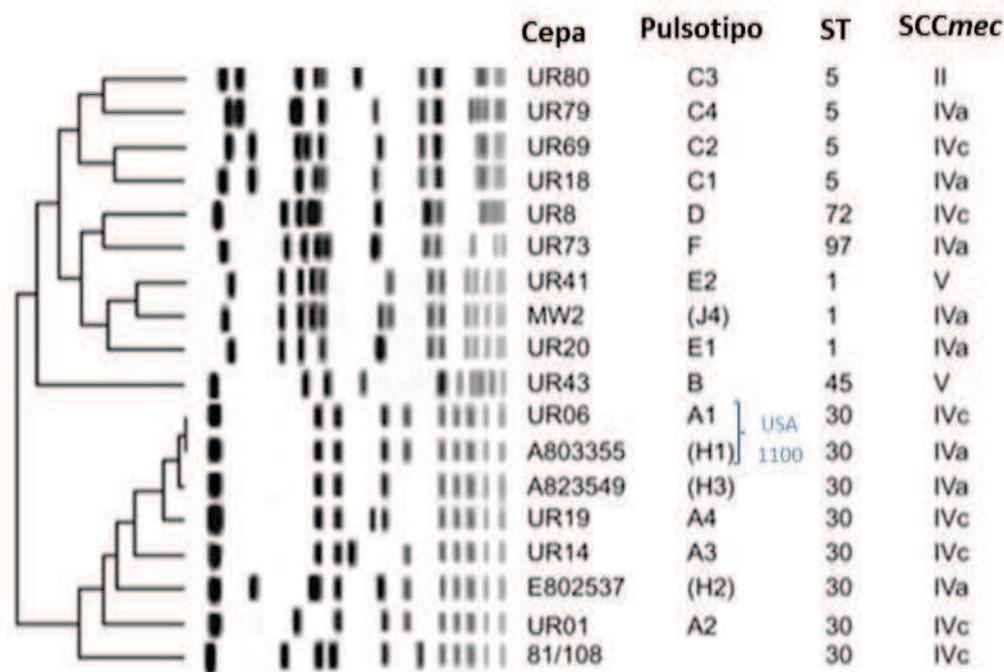


Figura 9. Dendrograma de PFGE. UR: cepas de Uruguay; A803355, A823549 y E802537: cepas de Australia; 81/108: cepa de Japón; MW2: cepa de Estados Unidos. Adaptado (Ma *et al.*, 2005)

2.5- Desarrollo de vacunas

El desarrollo de una vacuna segura y efectiva contra *S. aureus* es un objetivo que aún no se ha podido concretar.

La vacuna StaphVAX^R (Nabi Biopharmaceuticals) consiste en una vacuna compuesta de los polisacáridos capsulares de tipos 5 y 8 conjugados a una exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*. La misma fue desarrollada para prevenir bacteriemia en pacientes en diálisis, pero no dio los resultados esperados (Deresinski, 2008).

Otro intento, realizado con la vacuna V710^R ha fallado en la protección de la población de interés (Fowler *et al.*, 2013).

Hasta el momento, la estrategia de prevención por vacunas para *S. aureus* se ha basado en provocar la producción de anticuerpos opsonizantes, pero la inmunidad humoral puede ser inadecuada o al menos insuficiente para prevenir las infecciones por este microorganismo y sería necesario investigar en torno a la inmunidad mediada por células vía TH17/IL-17 (Proctor, 2012).

3- JUSTIFICACIÓN

En los comienzos del presente siglo se desarrolló en Uruguay un fenómeno epidemiológico sin precedentes en la región: la aparición y rápida diseminación de SAMR en la comunidad, creando una crítica situación que tuvo consecuencias importantes en las prácticas médicas. Normalmente, al tratarse de una infección de piel y partes blandas no se enviaban muestras al laboratorio, ya que se consideraba que un tratamiento empírico estándar con un antibiótico β -lactámico, generalmente una cefalosporina de primera generación, era siempre adecuado. No obstante, estas infecciones causadas por SAMR no respondían a ese tratamiento tradicional. Se observaba una mejora aparente, pero el paciente sufría recidivas o podía evolucionar hacia un cuadro séptico que eventualmente podía causarle la muerte.

Ante la nueva situación epidemiológica se tornó imprescindible el diagnóstico etiológico y las pruebas de susceptibilidad, así como una vigilancia nacional para monitorear la evolución de los patrones de susceptibilidad de este microorganismo en el tiempo.

En 2003 se documentaron en el país, cuadros sépticos severos por SAMR-com y algunas neumonías necrosantes graves y rápidamente mortales o hiperagudas

Estudios preliminares indicaban que los aislamientos de SAMR-com causantes de esa epidemia en Uruguay formaban parte, mayoritariamente, de un único clon, que poseía atributos especiales de virulencia y eran mayoritariamente sensible a otras familias de antibióticos.

En esta tesis se estudió una colección de cepas aisladas de pacientes comunitarios (ambulatorios) durante un período de 9 años (2003-2012), incluyendo, por lo tanto, cepas desde el momento pico de la epidemia y de los años sucesivos. Se exploró la evolución de la diversidad genética en el tiempo en relación a la presentación clínica, los perfiles de susceptibilidad, el tipo de *SCC_{mec}* y la presencia de factores de virulencia.

En lo que refiere a SAMR-hosp, la situación nacional permanecía invariable en cuanto a incidencia, pero se habían registrado cambios en las características fenotípicas de algunos aislamientos, con la aparición de perfiles menos resistentes, concretamente con susceptibilidad a gentamicina y/o trimetoprim/sulfametoxazol. Interesaba entonces conocer la diversidad genética de las cepas de SAMR-hosp circulantes en los últimos años para comprobar la eventual presencia de nuevos clones, de variantes del “clon brasileiro” que predominaba en Uruguay a fines del siglo XX y/o de la introducción de SAMR-com en los hospitales.

En consecuencia, en esta tesis también se incluyó una colección de cepas de pacientes hospitalizados durante un período de 10 años (2002-2012) con el mismo objetivo y enfoque que para los aislamientos comunitarios.

El establecimiento de una línea de base que identifique los clones circulantes de SAMR en el hospital y en la comunidad durante la última década, permitirá reconocer eventuales clones emergentes en el futuro.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo general

Caracterizar cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aisladas de infecciones en pacientes hospitalizados y en pacientes comunitarios durante el período 2002-2012.

4.2- Objetivos específicos

- Confirmar la identificación de *Staphylococcus aureus* y determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos.
- Confirmar la presencia del gen *mecA* de resistencia a meticilina y determinar el tipo de casete SCC*mec*.
- Analizar la presencia/ausencia de factores de virulencia (PVL y TSST-1) y relacionarla con los cuadros clínicos asociados.
- Estudiar los perfiles electroforéticos de los genomas bacterianos para clasificar los aislamientos en linajes filogenéticos relacionados o no a los clones internacionales previamente descritos y explorar la evolución de la diversidad genética en el tiempo.
- Analizar la distribución de los clones de SAMR durante el período de tiempo estudiado, conjugando la caracterización fenotípica y genotípica con los datos demográficos de los aislamientos.

5- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1- Material biológico

Se estudiaron 95 cepas de SAMR aisladas durante el período 2002-2012, provenientes de diversas instituciones públicas y privadas de nuestro país (Tabla 7).

Los datos disponibles de la colección de aislamientos no permitían aplicar las definiciones clásicas o alternativas para diferenciar entre infección hospitalaria o comunitaria. Pero se dividió la colección en esos dos grupos, en función de si los aislamientos provenían de

Tabla 7. Procedencia de los aislamientos

PROCEDENCIA	n (%)
H. de Clínicas	40 (42)
H. Evangélico	19 (20)
HPR	9 (9)
CASMU	6 (6)
Médica Uruguaya	3 (3)
H. Maciel	3 (3)
COMCAR	2 (2)
F. N. de Recursos	2 (2)
H. de Melo	2 (2)
H. Pasteur	1 (1)
H. Militar	1 (1)
H. Filtro	1 (1)
H. de San José	1 (1)
H. de Paysandú	1 (1)
H. de Fray Bentos	1 (1)
CIMA	1 (1)
L. Martínez Prado	1 (1)
H. de Florida	1 (1)
Total	95 (100)

H.: Hospital; L.: Laboratório;
 HPR: Hospital Pereira Rossell
 CASMU: Centro Asistencial del Sindicato Médico del Uruguay;
 COMCAR: Complejo Carcelario S. Vázquez;
 CIMA: Mutualista CIMA España

pacientes en emergencia o policlínica (comunitarios) o de pacientes hospitalizados. De esta manera, la colección comprendía 57 aislamientos de infecciones de pacientes comunitarios y 38 aislamientos de infecciones de pacientes hospitalizados.

Los cepas hospitalarias fueron aisladas entre los años 2002 y 2012; y las comunitarias entre los años 2003 y 2012.

En la mayoría de los casos se contó con el dato de la fecha de aislamiento, edad y sexo del paciente, tipo de muestra, cuadro clínico y evolución.

La mayoría (n= 26, 68%) de las infecciones con origen en el ámbito hospitalario eran invasivas, en cambio la mayoría (n=43, 75%) de las infecciones de origen comunitario eran de piel y partes blandas. Los cuadros invasivos incluyeron neumonía, endocarditis, bacteriemia y sepsis. Los cuadros de piel y partes blandas incluyeron forunculosis, abscesos, celulitis, conjuntivitis y lesiones de piel. Las infecciones de herida quirúrgica y de heridas por catéter no

fueron incluidas en los cuadros de piel y partes blandas, sino que constituyen un grupo aparte (“infecciones de herida quirúrgica o por catéter”).

La lista completa de las cepas estudiadas y sus características se presenta en el ANEXO I. En los estudios fenotípicos se utilizaron como control de calidad las cepas ATCC[®]25923, ATCC[®]29213, ATCC[®]43300 (“American Type Culture Collection”, EUA); OPS71 y OPS76 (Aislamientos utilizados en el control externo de desempeño de la red RELAVRA, Organización Panamericana de la Salud) (Tabla 8).

En los estudios genotípicos se utilizaron como control las siguientes cepas: COL (NRS100), MW2 (NRS123), N315 (NRS70) (“Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*”); NCTC8325 (National Collection of Type Cultures, Inglaterra); un aislamiento de *S. aureus* confirmado positivo para SCC*mec* tipo III cedido por Marta Mollerach (Universidad de Buenos Aires) y un aislamiento de *S. aureus* confirmado positivo para TSST-1 por el “Center for Disease Control and Prevention” (CDC, Atlanta, EUA) (Tabla 8).

En la muestra analizada se incluyeron dos cepas: S10.03 (PFGE USA1100, SCC*mec* tipo IVc, PVL positiva) y S18.04 (PFGE USA100, SCC*mec* tipo II, PVL negativa) que habían sido enviadas al CDC para su caracterización.

Tabla 8. Cepas de referencia y sus características de interés

NOMBRE	ESPECIE	ORIGEN	CARACT. FENOTÍPICAS	CARACT. GENOTÍPICAS
ATCC25923	<i>S.aureus</i>	Estados Unidos	Sensible a meticilina	<i>mecA</i> -
ATCC29213	<i>S.aureus</i>	Estados Unidos	Sensible a meticilina	<i>mecA</i> -
ATCC43300	<i>S.aureus</i>	Estados Unidos	Resistente a meticilina	<i>mecA</i> +
OPS71	<i>E. raffinosus</i>	Argentina		
OPS76	<i>S.epidermidis</i>	Argentina		
COL	<i>S.aureus</i>	Estados Unidos	Resistente a meticilina	<i>mecA</i> +; SCC <i>mec</i> Tipo I
N315	<i>S.aureus</i>	Japón	Resistente a meticilina	<i>mecA</i> +; SCC <i>mec</i> Tipo II
Cepa SCC <i>mec</i> III +	<i>S.aureus</i>	Argentina	Resistente a meticilina	<i>mecA</i> +; SCC <i>mec</i> Tipo III
MW2	<i>S.aureus</i>	Estados Unidos	Resistente a meticilina; PVL+	<i>mecA</i> +; SCC <i>mec</i> Tipo IV; <i>lukS</i> y <i>F-PV</i> +
NCTC8325	<i>S.aures</i>	-	Sensible a meticilina	<i>mecA</i> -; perfil de restricción con SmaI usado como control en PFGE
Cepa TSST-1 +	<i>S.aureus</i>	Uruguay	Resistente a meticilina; TSST-1+	<i>mecA</i> +; <i>tst</i> +

E: Enterococcus

Todas las cepas estudiadas fueron conservadas en medio Skim milk a -70°C en el banco histórico del Departamento de Laboratorios de Salud Pública.

5.2- Métodos

Las cepas fueron sembradas en medio agar tripticasa soja (TSA), a partir de la alícuota congelada, e incubadas a 35°C durante 24 horas. Se realizó un reaislamiento en las mismas condiciones y se procedió a la realización de los métodos fenotípicos y genotípicos.

Los protocolos completos se presentan en el ANEXO II.

5.2.1- Métodos fenotípicos

5.2.1.1- Identificación

Se confirmó la identificación de *S. aureus* mediante el análisis de la morfología de las colonias, tinción de Gram y las siguientes pruebas: catalasa, coagulasa y desoxirribonucleasa (ADNasa) (Winn *et al.*, 2008).

La prueba de catalasa, para diferenciar *S. aureus* de otros cocos Gram + (*Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp.), fue realizada en un portaobjetos, colocando una gota de agua a la cual se transfirieron células de una colonia aislada. Se agregaron unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% observándose la rápida aparición de burbujas producto de la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua por la enzima catalasa de *S. aureus*.

Se realizó la prueba de coagulasa en tubos mezclando una suspensión de bacterias en partes iguales con plasma de conejo. Luego de una incubación total de 24 horas en baño de agua a 37°C, pudo observarse la formación de un coágulo producto de la conversión del fibrinógeno en fibrina. Esta prueba positiva para *S. aureus* permitió diferenciarla de otras especies del género *Staphylococcus*.

Para la prueba de ADNasa se utilizó el medio ADNasa agar con verde metilo y se sembró la placa en forma de botón con el ansa cargada. Luego de una incubación de 24 horas a 35°C, se verificó la formación de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano como consecuencia de la depolimerización del ADN del medio por una enzima ADNasa específica de *S. aureus*.

En las tres pruebas se utilizó como control positivo la cepa ATCC25923. La cepa OPS71 fue utilizada como control negativo en la prueba de catalasa y la OPS76 como control negativo en las pruebas de coagulasa y ADNasa.

5.2.1.2- Susceptibilidad antimicrobiana

Los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de todas las cepas fueron determinados mediante los ensayos de disco difusión, tamizaje de oxacilina y concentración inhibitoria mínima (CIM) en agar, por el método epsilométrico (Etest[®], Biomerieux).

Los antibióticos utilizados fueron los definidos por la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos en América Latina, coordinada por la Organización Panamericana de la Salud.

Se utilizó la norma CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institut, 2013) tanto para la realización de las pruebas como para su interpretación. Inicialmente, cuando este estudio comenzó, se utilizó la norma CLSI 2009; desde dicha edición a la actual se han aprobado varias modificaciones para *S. aureus*, tanto en la metodología como en la interpretación. Por este motivo, finalmente se siguió el criterio de CLSI 2013, que recomienda cefoxitin en lugar de oxacilina para determinar la susceptibilidad a β -lactámicos.

En el ensayo de disco difusión se probaron los siguientes antibióticos: cefoxitin (FOX), penicilina (PEN), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), rifampicina (RIF), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), eritromicina (ERI), clindamicina (CLI) y cloranfenicol (CLO). El disco de oxacilina (OXA) fue ensayado para todas las cepas, basado en versiones anteriores de CLSI pero también porque permitió visualizar el fenotipo de heteroresistencia.

Se realizó una suspensión bacteriana correspondiente a 0.5 de la escala McFarland y se sembró en agar Mueller Hinton. Luego de colocar los discos de antibióticos, se incubó a 35°C durante 18 horas (24 horas para OXA) se midieron los halos de inhibición y se realizó la interpretación según CLSI. En este ensayo se utilizó la cepa ATCC 25923 como control de calidad.

Los discos de eritromicina y clindamicina fueron colocados a una distancia de 15-26 mm para la detección del fenotipo de resistencia inducible, el cual se evidencia por un achatamiento del halo de inhibición de clindamicina en forma de “D”.

El tamizaje en placas de agar con oxacilina fue realizado como confirmatorio de la resistencia a meticilina. El ensayo consistió en sembrar los aislamientos en placas de agar Mueller Hinton con 4% de NaCl y oxacilina en una concentración final de 6 μ g/ml. La expresión de la resistencia, además de ser termosensible, se ve favorecida por la hiperosmolaridad. Las suspensiones bacterianas al 0.5 McFarland se sembraron en forma de botón con hisopo estéril y luego de una incubación de 24 horas a 35°C, se verificó el

crecimiento. La presencia de más de una colonia fue interpretada como resistencia a oxacilina. Las cepas ATCC 29213 y ATCC 43300 fueron utilizadas como controles negativo y positivo, respectivamente.

Se determinó la CIM para OXA y VAN de todos los aislamientos y para ERI y CLI sólo de los aislamientos resistentes. Se utilizó el método epsilométrico Etest[®], que consiste en enfrentar un cultivo bacteriano a un gradiente de concentración del antibiótico, el cual produce por difusión una elipse de inhibición.

Las tiras de antibióticos se colocaron en placas de agar Mueller Hinton sembradas con una suspensión bacteriana correspondiente al 0.5 de la escala McFarland. Se incubó durante 24 horas a 35°C para OXA y VAN y durante 18 horas a la misma temperatura para ERI y CLI. Transcurrido el tiempo de incubación se leyó la CIM en el punto que el borde de la elipse intersectó la tira. En este ensayo se utilizó la cepa ATCC 29213 como control de calidad.

La mayoría de las cepas con una CIM de 2 µg/ml para VAN, fueron analizadas por el macrométodo Etest[®] (Satola *et al.*, 2011), porque este tipo de cepas han sido asociadas con fallas en el tratamiento y fenotipo hVISA. Se realizó una suspensión bacteriana al 2 McFarland y se sembraron 200 µl en agar BHI. Luego de colocar una tira de Etest[®] de VAN y otra de teicoplanina (TEI), se incubó durante 48 horas a 35°C. Aquellas cepas con valores equivalentes a CIM ≥ 8 µg/ml para ambos antibióticos o ≥ 12 µg/ml para TEI, fueron definidas como hVISA.

5.2.2- Métodos genotípicos

Para la realización de todos los ensayos de PCR, el ADN fue extraído mediante la utilización de un sistema comercial basado en la precipitación, “Genomic DNA Purification Kit[®]” (Fermentas). El procedimiento fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.2.1- Detección del gen *mecA* de resistencia a meticilina y determinación del tipo de casete SCC*mec* mediante PCR

La presencia del gen *mecA* fue evidenciada según Oliveira y col. (Oliveira & de Lencastre, 2002) utilizando la cepa MW2 como control positivo. La detección de *mecA* era parte de una PCR múltiple propuesta por estos autores para determinar el tipo de casete SCC*mec*

del I al IV, y se utilizó inicialmente para definir el tipo de *SCCmec*. Este método presentó problemas de inespecificidades o carencia de las bandas esperadas, por lo cual tuvo que ser sustituido.

Es así entonces que se realizó una PCR múltiple de detección del complejo *ccr* (*ccrAB1*, *ccrAB2* y *ccrAB3*) con los cebadores descritos por Ito (Ito *et al.*, 2001). Paralelamente a los resultados obtenidos para dicho complejo, se realizó en cada caso la PCR correspondiente a la clase de complejo *mec* (clase A o clase B) (Katayama *et al.*, 2001, Gardella *et al.* 2011).

Se utilizaron las cepas COL, N315, un aislamiento caracterizado *SCCmec* tipo III y MW2 como controles positivos para los *SCCmec* tipo I, II, III y IV, respectivamente.

Aquellas cepas que dieron resultado negativo para los *SCCmec* tipo I al IV fueron analizadas para la presencia del *SCCmec* tipo V (Zhang *et al.*, 2005).

5.2.2.2- Detección de los genes para la leucocidina Panton-Valentine mediante PCR

La detección de los genes *lukS-PV* y *lukF-PV* fue realizada con una adaptación del protocolo de Lina y cols. (Lina *et al.*, 1999) que consistió en la elevación de la temperatura de alineamiento para eliminar amplificaciones inespecíficas.

Se utilizó como control positivo la cepa MW2.

5.2.2.3- Detección del gen para la toxina del Síndrome de Shock Tóxico 1 mediante PCR

La presencia del gen para la TSST-1 fue detectada según una adaptación al protocolo de Johnson y cols. (Johnson *et al.*, 1991), que consistió en bajar la temperatura de alineamiento ya que con la temperatura propuesta se obtenía una pobre amplificación.

Se utilizó como control positivo un aislamiento caracterizado positivo para dicha toxina por el CDC.

5.2.2.4- Electroforesis en campos pulsados

El ensayo de PFGE fue una adaptación del protocolo de Chung y cols. (Chung *et al.*, 2000), modificando el método de formación de los bloques de agarosa, ya que en esta tesis fueron utilizados moldes comerciales. Además se sustituyó el uso del tampón PIV por TE

porque se comprobó que facilitaba la manipulación de la agarosa en la preparación de los bloques. El cromosoma bacteriano fue digerido con una enzima de restricción de corte poco frecuente, *Sma*I y resuelto por electroforesis en campos pulsados. Se utilizó como referencia la cepa de *S. aureus* NCTC8325.

Las cepas fueron inoculadas en caldo tripticasa soja (TSB) e incubadas durante toda la noche en baño de agua a 37°C. Se prepararon suspensiones celulares con TE, se mezclaron con agarosa para PFGE al 1.5% y se colocaron en moldes para bloques (2 bloques por cepa).

Los bloques fueron incubados en solución de lisis durante 5 horas a 37°C y luego en solución ESP conteniendo proteinasa K, durante toda la noche a 50°C. Al día siguiente se realizaron varios lavados con TE para eliminar la proteinasa K.

Se transfirió un tercio de bloque por cepa a una solución conteniendo solamente el tampón de restricción y se incubó durante una hora a 25°C. Luego se incubó en tampón de restricción con la enzima *Sma*I, a 25°C durante toda la noche. Al día siguiente, la reacción fue detenida agregando 5 µl de tampón de carga.

Se preparó un gel de agarosa para PFGE al 1% y se incluyeron los bloques en el mismo.

La electroforesis fue realizada en un equipo CHEF –DR III (BioRad), en tampón TBE 0.5X a 11.3°C y 6 volts/cm durante 23 horas, alternando pulsos de 5 y 35 segundos.

Luego de teñir el gel con bromuro de etidio a una concentración de 1µg/ml y visualizarlo con luz ultravioleta, se tomó una fotografía que fue guardada en formato TIFF (del inglés, “tagged image file format”) para su posterior análisis.

Los patrones de bandas obtenidos se designaron de acuerdo al criterio de Tenover (Tenover *et al.*, 1995) por el cual se consideraron como aislamientos idénticos aquellos que no tenían diferencia de bandas, aislamientos estrechamente relacionados a los que diferían en una a tres bandas, aislamientos posiblemente relacionados a los que tenían cuatro a seis bandas de diferencia y aislamientos no relacionados a los que diferían en 7 o más bandas.

Los aislamientos idénticos fueron identificados como un pulsotipo, con una letra mayúscula y los estrechamente y posiblemente relacionados, como subtipos con la letra mayúscula y un número.

Las imágenes de los geles fueron analizadas en el programa Gel Compar II 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) para verificar las relaciones entre los pulsotipos y sus subtipos. Se utilizó el índice de DICE para generar matrices de similitud y se construyó el dendrograma con el algoritmo UPGMA (del inglés, “unweithed pair-group method of averages algorithm”).

6- RESULTADOS

6.1- Aspectos epidemiológicos

Se estudiaron 95 cepas que fueron confirmadas en su identificación como *S. aureus*. De este conjunto de cepas, 38 provenían de infecciones de pacientes hospitalizados y 57 de infecciones de pacientes comunitarios.

Se contaba con el dato de edad de 35 pacientes hospitalizados (de los 3 restantes a los cuales les faltaba este dato, dos eran adultos). La mediana de edad en este grupo fue de 60 años (16-87 años).

En el grupo de pacientes comunitarios se contaba con el dato de edad de 47 personas de las cuales 5 eran niños menores de 1 año. La mediana de edad para los mayores de un año fue de 25.5 años (4-87 años). Entre las 10 personas sin dato de edad, se incluían 4 niños y 5 adultos.

La distribución de edades de cada grupo se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Distribución de edades

(EDAD EN AÑOS / n)	< 20	20-40	>40
PACIENTES HOSPITALIZADOS (n=35)	1	6	28
PACIENTES COMUNITARIOS (n=51)	20	24	7

Los aislamientos de pacientes hospitalizados provenían de procesos invasivos (n=26), infecciones de herida quirúrgica o por catéter (n=8), infecciones de piel y partes blandas (n=2) e infección urinaria (n=1) (Figura 10). El paciente restante era un trasplantado renal, del que se obtuvo SAMR en una muestra de exudado nasal, como parte de los cultivos de vigilancia para control de infecciones en esos pacientes. En cuanto a los procesos invasivos, mayoritariamente fueron asociados a las prácticas hospitalarias (diálisis, cirugías).

En el grupo de pacientes comunitarios, 43 provenían de infecciones de piel y partes blandas y 13 de procesos invasivos (entre los que se incluía la neumonía necrosante comunitaria) y del restante no se obtuvo dato del cuadro clínico (Figura 10). La mayor parte de los procesos invasivos se desarrollaron a punto de partida de una infección de piel

y partes blandas. Cinco pacientes comunitarios fallecieron, dos de ellos presentaron bacteriemia, dos presentaron sepsis con un cuadro anterior de infección de piel y uno presentó neumonía necrosante. Se conocía el dato de edad de 4 de ellos, los cuales tenían 8, 15, 16 y 38 años.

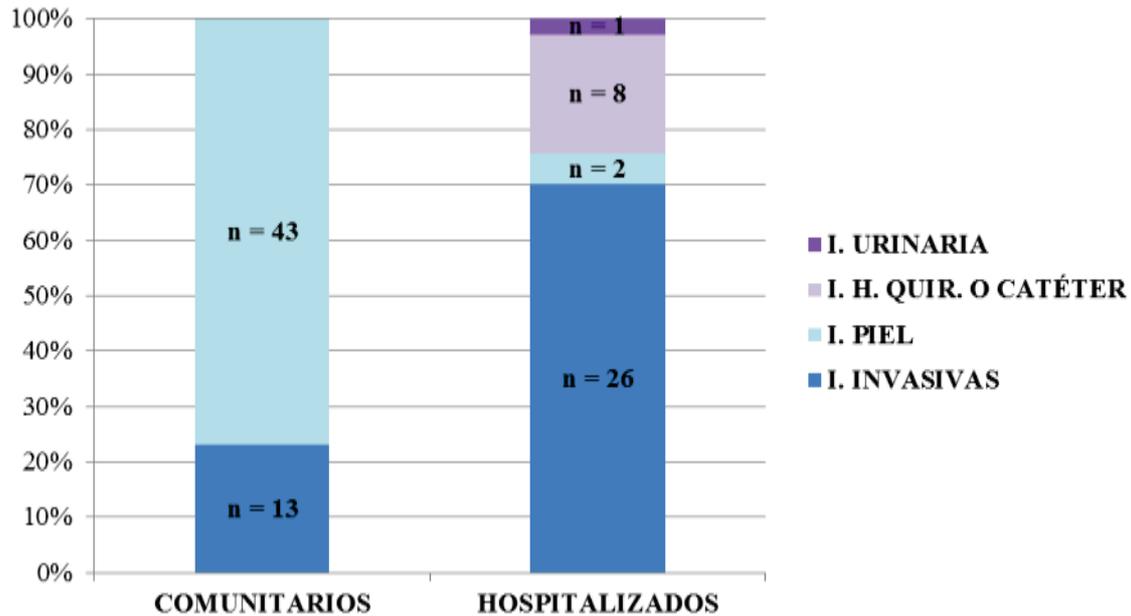


Figura 10. Distribución de tipos de infecciones. Comunitarios, n=56; Hospitalarios, n=37. I.: Infección; I.H.Quir.: Infección herida quirúrgica

6.2- Susceptibilidad antimicrobiana

El 100% de las cepas fue resistente a FOX, OXA y PEN. Se detectó el fenotipo de heteroresistencia a oxacilina (disco difusión) en 33 aislamientos de pacientes comunitarios y en 5 de pacientes hospitalizados.

Los valores de CIM de OXA variaron desde 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a $>256 \mu\text{g}/\text{mL}$. El 71% (n=27) de los aislamientos de pacientes hospitalizados presentó CIM $> 256 \mu\text{g}/\text{mL}$; en cambio solamente el 32% (n= 18) de los aislamientos de pacientes comunitarios presentó este valor de CIM.

Todas las cepas fueron sensibles a VAN por el método epsilométrico. Un 52% (n=49) presentó CIM de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un 48% (n=46) presentó CIM de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Un total de 42 cepas con CIM de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue analizado por el macrométodo epsilométrico para detectar

sensibilidad disminuida a VAN. Seis aislamientos fueron identificados como hVISA (14%) y sólo uno provenía de un paciente comunitario.

En cuanto a la resistencia a ERI y CLI, 61% (n=58) del total de aislamientos presentó el fenotipo MLS_B. Además, 36% (n=21) de ellos correspondían al fenotipo inducible (iMLS_B) (Tabla 10).

Tabla 10. Fenotipos de susceptibilidad a macrólidos y lincosamidas

FENOTIPO	n (%)
iMLS _B (D)	2 (2)
iMLS _B (D+)	19 (20)
cMLS _B (HD)	31 (33)
cMLS _B (R)	6 (6)
MS _B	1 (1)
SENSIBLE	36 (38)
TOTAL	95 (100)

La mayoría de las cepas de pacientes hospitalizados (n=33) presentó el fenotipo MLS_B, principalmente el constitutivo (R y HD) y solamente 4, el inducible (D+) (Figura 11).

En cambio de las 25 cepas de pacientes comunitarios que presentaron fenotipo MLS_B, 17 fueron resistentes por inducción (D y D+) y 8 fueron resistentes constitutivas (R y HD) (Figura 12).

La resistencia a ERI y CLI obtenida por disco difusión, fue confirmada por CIM. En todos los casos, la CIM de ERI tanto en el fenotipo constitutivo como en el inducible fue mayor a 256 µg/mL.

La CIM de CLI en todas las cepas con fenotipo constitutivo fue mayor a 256 µg/mL; y en las que presentaron fenotipo inducible estuvo entre 0.064 y 0.125 µg/mL en el grupo hospitalario y entre 0.064 y 0.25 µg/mL en el comunitario.

Una cepa de la comunidad presentó fenotipo MS_B con CIM de ERI de 32 µg/mL y de CLI de 0.125 µg/mL.

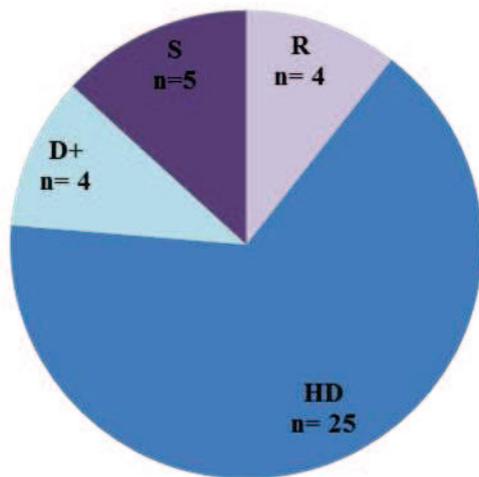


Figura 11. Pacientes hospitalizados (n=38). Fenotipos de susceptibilidad a macrólidos y lincosamidas. S: sensible; R: MLS_B constitutivo homotípico; HD: MLS_B constitutivo heterotípico. D+: MLS_B inducible heterotípico.

Nota: MLS_B: resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B.

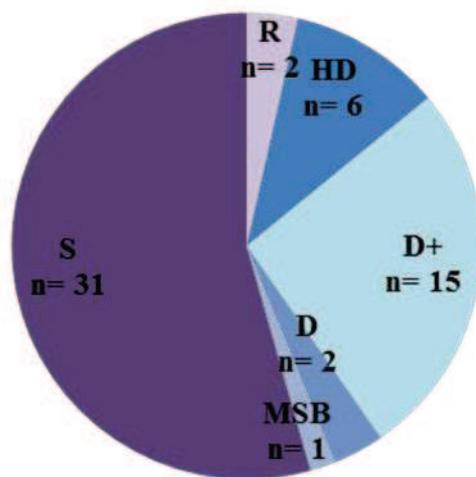


Figura 12. Pacientes comunitarios (n=57). Fenotipos de susceptibilidad a macrólidos y lincosamidas. S: sensible; R: MLS_B constitutivo homotípico; HD: MLS_B constitutivo heterotípico; D: MLS_B inducible homotípico; D+: MLS_B inducible heterotípico.

Nota: MLS_B: resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B; MS_B: resistencia a macrólidos y estreptogramina B.

Las cepas de pacientes hospitalizados mostraron un alto porcentaje de resistencia a los otros antibióticos ensayados (Figura 13), en contraste con las de pacientes comunitarios (Figura 14).

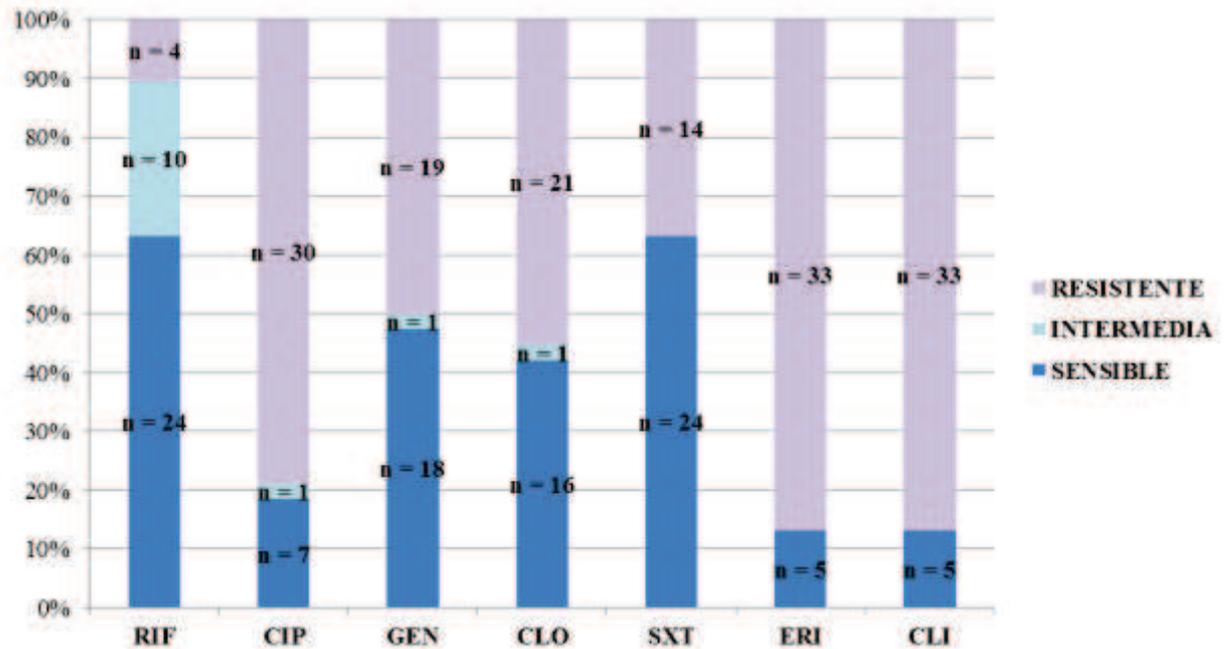


Figura 13. Pacientes hospitalizados (n=38). Susceptibilidad a los antibióticos.

RIF: rifampicina; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; CLO: cloranfenicol; SXT: trimetoprim/sufametoxazol; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina.

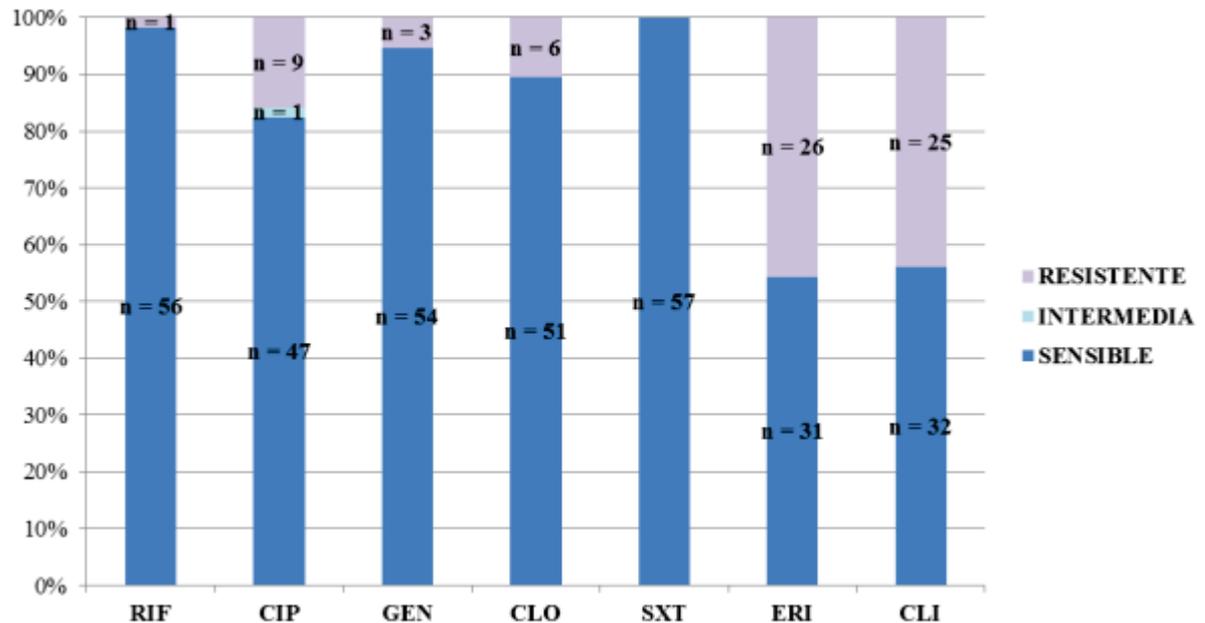


Figura 14. Pacientes comunitarios (n=57). Susceptibilidad a los antibióticos.

RIF: rifampicina; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; CLO: cloranfenicol; SXT: trimetoprim/sufametoxazol; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina.

Se obtuvieron 12 perfiles diferentes de resistencia antimicrobiana, en los que se integró a las categorías de intermedio y resistente (Tabla 11). El 76% de las cepas de pacientes comunitarios eran resistentes solamente a β -lactámicos o agregaban el fenotipo MLS_B . Las cepas de pacientes hospitalizados en cambio eran mayoritariamente (91%) multiresistentes, siendo el perfil más frecuente el que incluía 8 de los 9 grupos de antibióticos probados. De los 6 aislamientos hVISA por el macrométodo elipsométrico, solamente uno era panresistente, es decir, resistente a todos los antibióticos probados. Los perfiles de resistencia de los restantes eran: a β -lactámicos más MLS_B más dos antibióticos (n=2); a siete grupos de antibióticos (n=1), a β -lactámicos más MLS_B más un antibiótico (n=1) y sólo a β -lactámicos (n=1).

Tabla 11. Perfiles de resistencia antimicrobiana

PERFIL DE RESISTENCIA *	PACIENTES HOSPITALIZADOS	PACIENTES COMUNITARIOS
	n (%)	n (%)
SÓLO B-LACTÁMICOS	4 (11)	26 (46)
B-LACTÁMICOS + CLO (o GEN)	0 (0)	4 (7)
B-LACTÁMICOS + ERI + CIP	0 (0)	1 (2)
B-LACTÁMICOS + CIP + GEN + CLO	1 (3)	1 (2)
B-LACTÁMICOS + MLS_B	0 (0)	17 (30)
B-LACTÁMICOS + MLS_B + CIP (o CLO o RIF)	9 (24)	5 (9)
B-LACTÁMICOS + MLS_B + CIP + CLO (o CIP + GEN o CIP + RIF)	7 (18)	2 (4)
B-LACTÁMICOS + MLS_B + GEN + CLO	1 (3)	0 (0)
B-LACTÁMICOS + MLS_B + CIP + GEN + CLO	2 (5)	1 (2)
B-LACTÁMICOS + MLS_B + CIP + GEN + SXT	1 (3)	0 (0)
B-LACTÁMICOS + MLS_B + CIP + GEN + CLO + SXT	1 (3)	0 (0)
B-LACTÁMICOS + MLS_B + CIP + GEN + CLO + SXT + RIF	12 (32)	0 (0)
TOTAL	38 (100)	57 (100)

* No incluye la susceptibilidad a VAN

6.3- Presencia del gen *mecA* y tipos de casete *SCCmec*

En todas las cepas se observó una banda del tamaño esperado para el gen *mecA* de resistencia a meticilina (Figura 15).

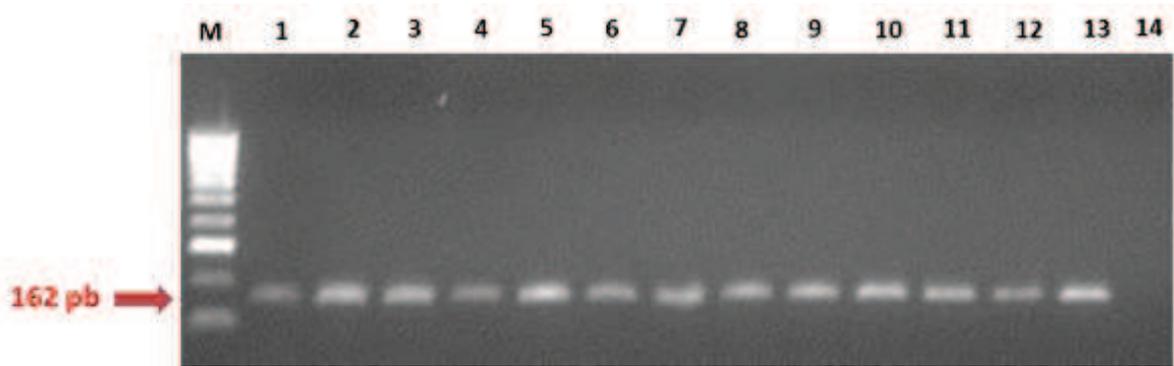


Figura 15. Detección del gen *mecA* mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa 2% de algunos aislamientos. Carriles 1 a 13: *mecA* +; carril 14: control -; M: marcador de 100 pb.

Los SCC*mec* tipo I, II, III, IV y V fueron detectados en un 1% (n=1), 18% (n=17), 14% (n=13), 63% (n=60) y 2% (n= 2), respectivamente (Figuras 16, 17 y 18). Dos cepas no pudieron ser tipificadas (S/T) para el SCC*mec* por falta de bandas en la detección del complejo *mec*. Estas cepas presentaron complejo *ccrAB2* y fueron de subtipos del pulsotipo A (USA1100) por lo cual cabía esperar que fueran tipo IV.

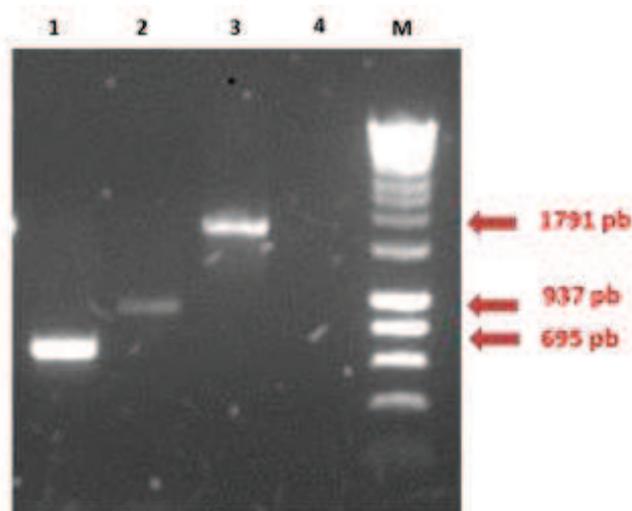


Figura 16. Tipificación del complejo *ccr* por PCR múltiple y electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Carril 1: *ccrAB1*; carril 2: *ccrAB2*; carril 3: *ccrAB3*; carril 4: control negativo; M: marcador de 200 a 10000 pb.

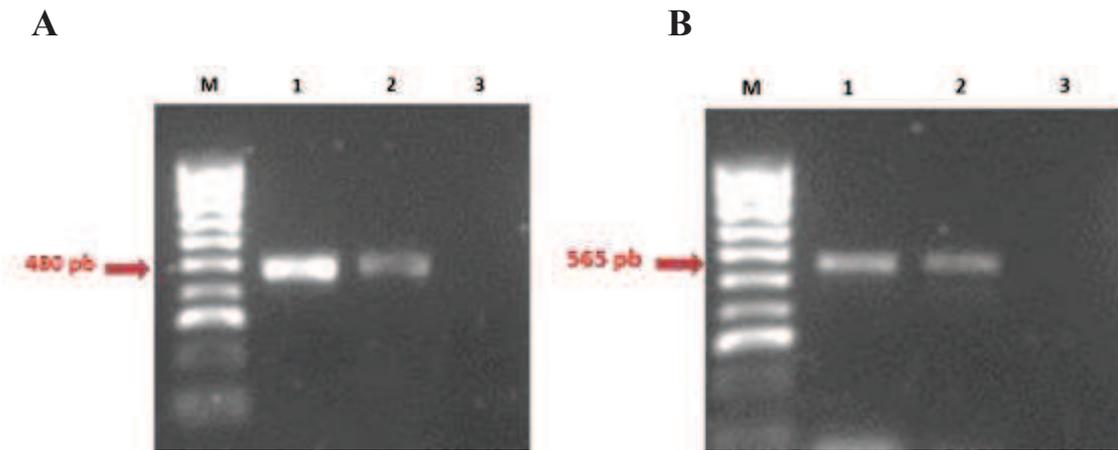


Figura 17. A: Detección de los complejos *mec* clase A y B mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa 1.5%. A: complejo *mec* clase A, carriles 1 y 2: complejo *mec* clase A +; carril 3: control -; B: complejo *mec* clase B, carriles 1 y 2: complejo *mec* clase B +; carril 3: control -; M: marcador de 100 pb.

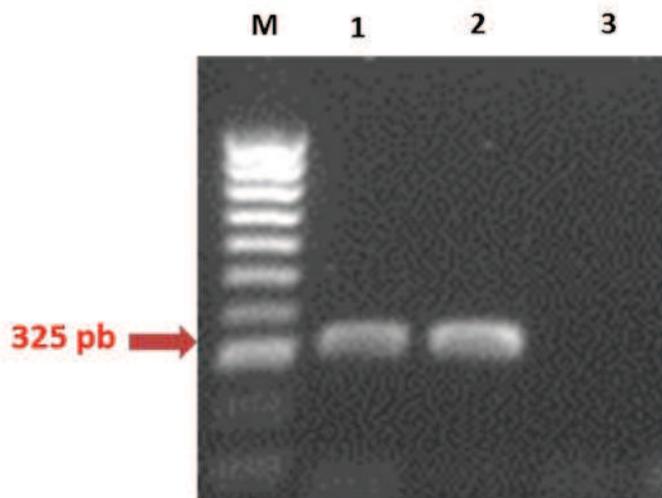


Figura 18. Detección de SCC*mec* tipo V mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Carriles 1 y 2: SCC*mec* tipo V +; carril 3: control -; M: marcador de 100 pb.

Las cepas de pacientes hospitalizados presentaron SCC*mec* tipos I, II, III, IV y V (Figura 19) a diferencia de las de pacientes comunitarios que presentaron solamente los tipos II y IV (Figura 20).

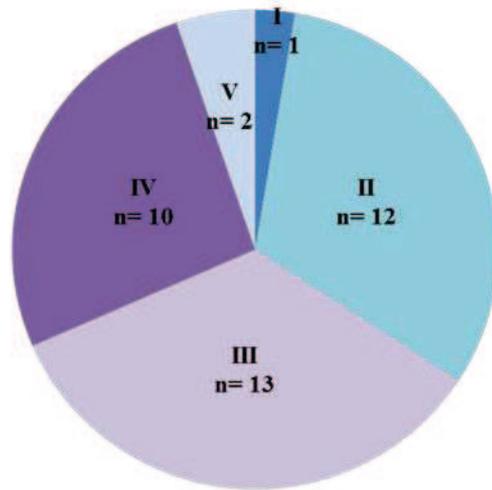


Figura 19. Distribución de SCCmec en aislamientos de pacientes hospitalizados (n=38).

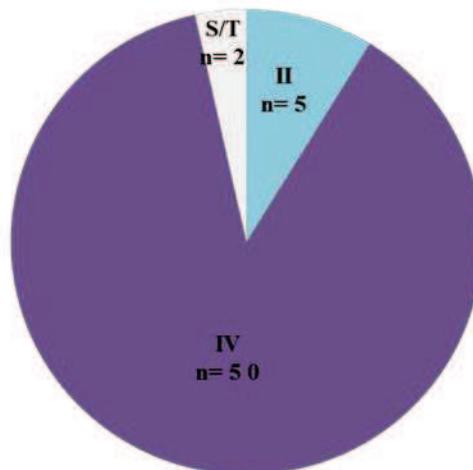


Figura 20. Distribución de tipos SCCmec en aislamientos de pacientes comunitarios (n=57).

La distribución de los tipos SCCmec fue diferente entre los ámbitos comunitario y hospitalario, con un claro predominio del tipo IV entre los aislamientos de la comunidad. También se observó variación a lo largo del período estudiado, fundamentalmente en los aislamientos hospitalarios (Figura 21).

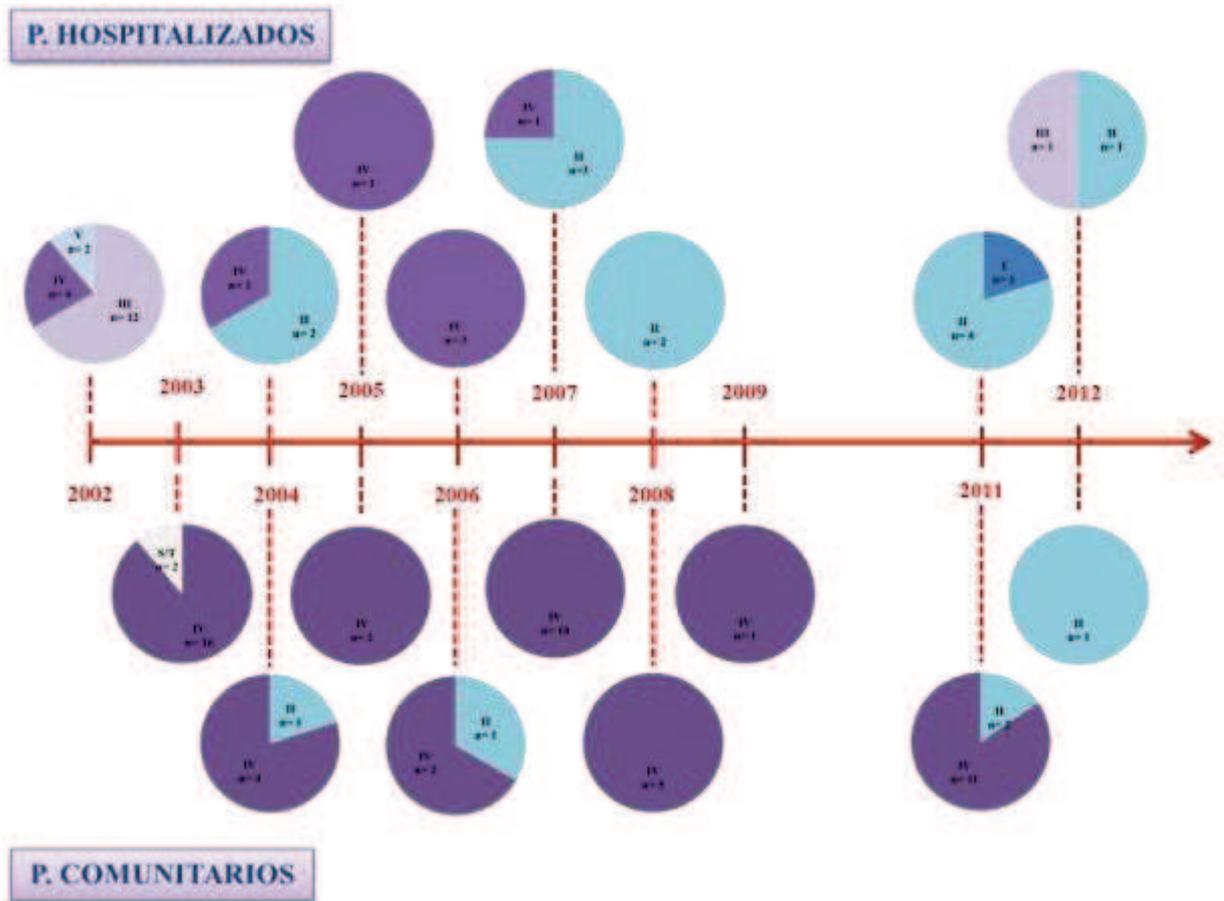


Figura 21. Evolución temporal de la distribución de SCCmec en la comunidad y en el hospital.

Los SCCmec tipo IV se asociaron mayoritariamente a infecciones de piel (63%) y los SCCmec tipo III mayoritariamente a infecciones invasivas (77%). El SCCmec tipo II tuvo una distribución más homogénea entre aislamientos de diferentes orígenes, mientras que los SCCmec tipos I y V fueron poco frecuentes (Tabla 12).

Tabla 12. Asociación entre el tipo de SCCmec y los tipos de infección

	SCCmec tipo I n (%)	SCCmec tipo II n (%)	SCCmec tipo III n (%)	SCCmec tipo IV n (%)	SCCmec tipo V n (%)
I. INVASIVAS	0 (0)	8 (47)	10 (77)	20 (33)	1 (50)
I. PIEL	0 (0)	4 (24)	0 (0)	38 (63)	1 (50)
I. H. QUIR. O CÁT.	1 (100)	3 (18)	3 (23)	1 (2)	0 (0)
I. URINARIA	0 (0)	1 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SIN DATO	0 (0)	1 (6)	0 (0)	1 (2)	0 (0)
TOTAL	1 (100)	17 (100)	13 (100)	60 (100)	2 (100)

I: Infección; H. Quir: Herida quirúrgica; Cát: catéter

La única cepa con *SCCmec* tipo I presentó un perfil de resistencia que incluía, además de los β -lactámicos, el fenotipo MLS_B y dos antibióticos más. Las cepas con *SCCmec* tipo II presentaron resistencia a β -lactámicos, MLS_B y uno o dos antibióticos más. Dos cepas con *SCCmec* tipo II fueron hVISA.

El 100% de las cepas con *SCCmec* tipo III presentó resistencia a β -lactámicos, MLS_B y por lo menos a tres antibióticos más, incluyendo en todos los casos a SXT. También en este grupo dos cepas fueron hVISA.

El 47% de las cepas con *SCCmec* tipo IV presentó resistencia sólo a β -lactámicos y el 30% a β -lactámicos más MLS_B . El 23% restante presentó variedad de perfiles, incluyendo una cepa aislada de un paciente hospitalario, resistente a ocho de los antibióticos probados (no hVISA). Dos cepas con *SCCmec* tipo IV fueron hVISA.

Las 2 cepas con *SCCmec* tipo V presentaron resistencia a β -lactámicos y MLS_B más dos o tres antibióticos.

6.4- Factores de virulencia

Los genes *lukS* y *lukF* que codifican para la PVL fueron detectados en el 58% (n=55) del total de las cepas estudiadas. Los aislamientos de pacientes comunitarios presentaron PVL en el 88% (n= 50) de los casos y los de hospitalizados en el 13% (n=5) (Figura 22).

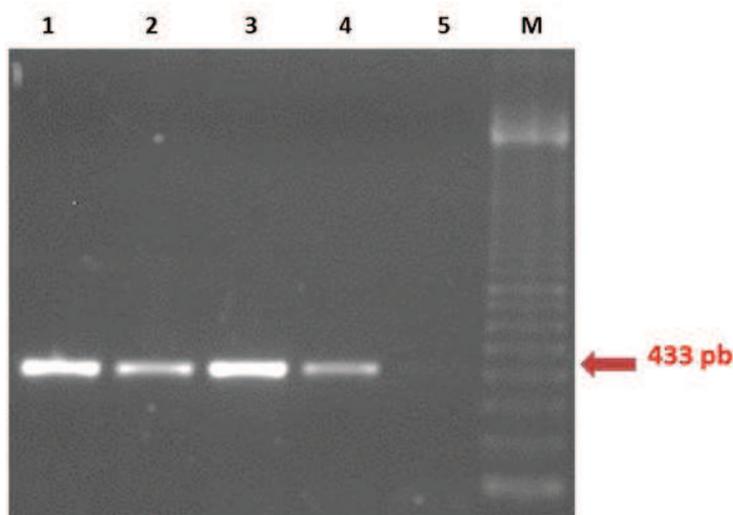


Figura 22. Detección de los genes *luk-PV* mediante co-amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Carriles 1 a 4: *lukS* y *lukF-PV*+; carril 5: control -; M: marcador de 100 pb.

La PVL fue hallada asociada al SCCmec tipo IV en todos los casos, excepto en dos cepas con SCCmec tipo III y dos cepas que no pudieron ser tipificadas para SCCmec. El 85% de las cepas con SCCmec tipo IV eran PVL positivas pero solamente el 15% de las cepas con SCCmec tipo III presentó PVL.

En los pacientes comunitarios el 100% de los aislamientos asociados a forunculosis, abscesos, sepsis y neumonía poseían los genes *lukPV*; el porcentaje disminuyó pero continuó siendo alto para cepas asociadas a infecciones de heridas (lesiones de piel), celulitis y bacteriemia (87, 67, y 80%, respectivamente). No se detectó en otras infecciones como úlcera ocular o conjuntivitis (Tabla 13).

En los pacientes hospitalizados, las 5 cepas productoras de PVL no se asociaron a un tipo de infección, sino que fueron aisladas de herida quirúrgica o catéter, bacteriemia, sepsis y endocarditis (Tabla 13).

Tabla 13. Producción de PVL asociada a los distintos tipos de infección

P. COMUNITARIOS	Nº CEPAS	Nº (%) PVL +
IPPB		
FORUNCULOSIS	9	9 (100)
ABSCESOS	13	13 (100)
CELULITIS	3	2 (67)
LESIONES PIEL	15	13 (87)
OTRAS	3	0 (0)
I INVASIVAS		
BACTERIEMIA	5	4 (80)
SEPSIS	3	3 (100)
NEUMONÍA	5	5 (100)
P. HOSPITALIZADOS		
IPPB		
ABSCESOS	1	0 (0)
LESIONES PIEL	1	0 (0)
I HER. QUIR. O CÁT.		
I URINARIA	1	0 (0)
I INVASIVAS		
BACTERIEMIA	14	2 (14)
SEPSIS	5	1 (20)
ENDOCARDITIS	2	1 (50)
NEUMONÍA	4	0 (0)
PERITONITIS	1	0 (0)

Solamente se identificó el gen que codifica para la TSST-1 (Figura 23) en una única cepa aislada de infección invasiva de un paciente hospitalizado, que no presentaba síndrome de shock tóxico. La cepa contenía un SCC mec tipo IV, perfil de resistencia sólo a β -lactámicos y no poseía PVL.

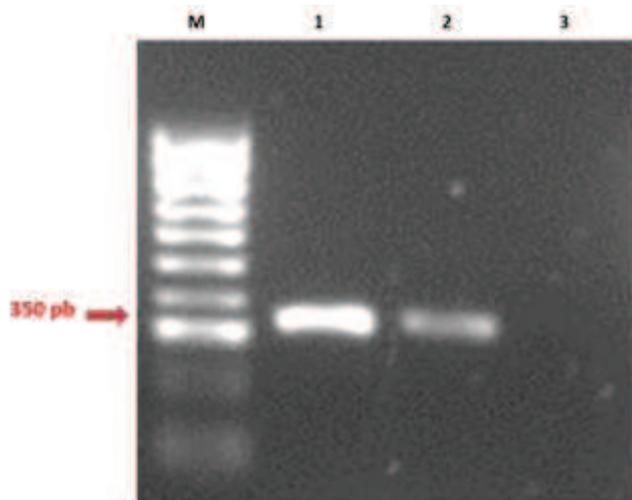


Figura 23. Detección de gen *tst* mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Carriles 1 y 2: *tst* +; carril 3: control -; M: marcador de 100 pb.

6.5- Análisis de pulsotipos por PFGE

La restricción con la enzima SmaI generó entre 8 y 16 fragmentos de ADN genómico. Mediante el análisis de los perfiles de bandas obtenidos de las 95 cepas de SAMR, se obtuvieron 10 pulsotipos (A-J), con subtipos en la mayoría de los casos, que fueron nombrados con la letra del pulsotipo más un número (A1-A9; B1-B6; D1-D5; E1-E3; G1 y H1). La figura 24 muestra algunos de los pulsotipos y subtipos obtenidos.

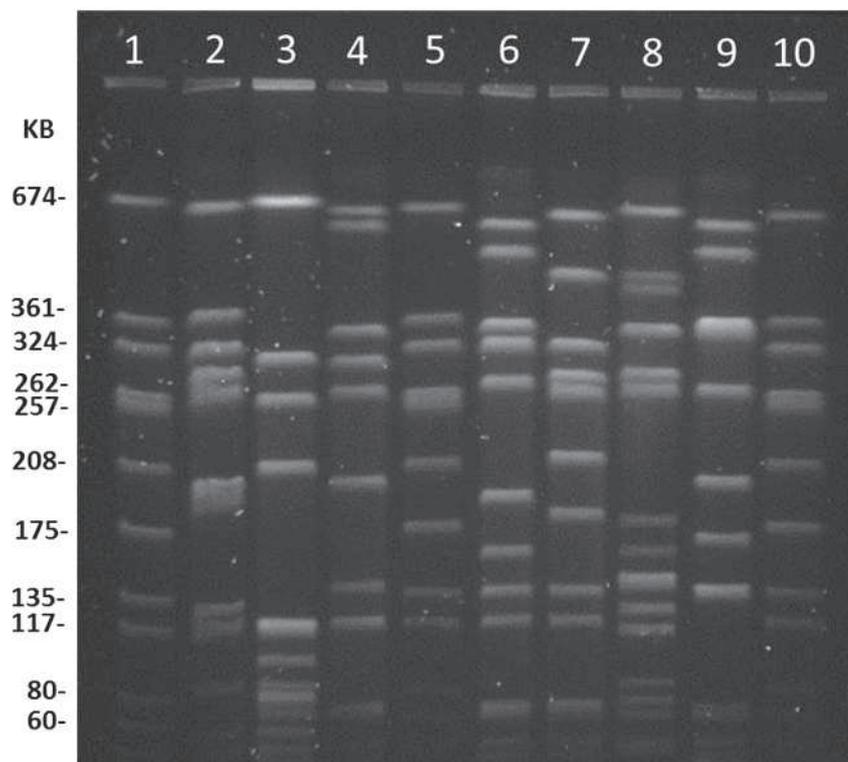


Figura 24. Restricción de ADN genómico con *Sma*I y resolución mediante PFGE. Carriles 1, 5 y 10: cepa de referencia NCTC8325 (marcador); carril 2: E3; carril 3: F; carril 4: H; carril 6: G1; carril 7: B6; carril 8: I; carril 9: G.

El pulsotipo A fue el mayoritario y también el más diverso con 9 subtipos. Todas las cepas (51/95) de este pulsotipo (y sus subtipos) presentaron *SCCmec* tipo IV (excepto dos cepas que no pudieron ser tipificadas para *SCCmec* pero presentaron complejo *ccrAB2* por lo cual podría deducirse que fueran tipo IV) y fueron PVL positivas (Tabla 14). La mayor parte (96%) de las cepas que presentaron este pulsotipo y sus subtipos, fueron aisladas de pacientes comunitarios a lo largo todo el período de tiempo estudiado. El perfil de restricción del pulsotipo A es idéntico al que se observó mayoritariamente en las cepas de SAMR que se habían identificado en el brote comunitario en Uruguay en el año 2003 y también se corresponde con el perfil de PFGE denominado USA1100. Los aislamientos de este pulsotipo y sus subtipos presentaron un alto porcentaje de sensibilidad a los antibióticos, con un 39% de cepas de fenotipo MLS_B (mayoría $iMLS_B$).

El pulsotipo B (con 6 subtipos) presentó un perfil de bandas idéntico al perfil PFGE USA100 del clon “New York/Japón” que posee *SCCmec* tipo II. Todos los aislamientos (n=19) con este pulsotipo (y sus subtipos), presentaron *SCCmec* tipo II, excepto en dos aislamientos que poseían *SCCmec* tipo IV, todos fueron PVL negativos y en su mayoría

(68%) provenían de pacientes hospitalizados entre los años 2004 y 2011. Dos cepas con este pulsotipo y subtipos fueron hVISA.

El pulsotipo D con sus 5 subtipos (n=13) presentó un perfil de restricción similar al del clon brasilero circulante en Uruguay antes del año 2000 y en esta tesis fue detectado en el año 2002, en cepas de pacientes hospitalizados con SCCmec tipo III (excepto una con SCCmec tipo IV) y perfil de multiresistencia a antibióticos, incluyendo la resistencia al SXT y dos cepas hVISA. Solamente tres cepas presentaron PVL.

El pulsotipo E con sus 3 subtipos (n=4) se detectó en cepas de pacientes hospitalizados en los años 2002 (n=3) y 2005 (n=1), con SCCmec tipo IV y V, mayoría (n=3) con resistencia a múltiples antibióticos y todas sensibles a SXT.

El pulsotipo G y su subtipo (n=2) presentó un perfil de restricción similar al del clon cordobés y estas cepas de pacientes hospitalizados en los años 2006 y 2011, presentaron un perfil de mayor sensibilidad a los antibióticos incluida la sensibilidad al SXT (al igual que ese clon), SCCmec de los tipos I y IV y una de ellas fue hVISA.

Las 2 cepas dentro del pulsotipo H, aisladas de pacientes hospitalizados en 2002, presentaron SCCmec tipo IV, fueron PVL negativas y una cepa fue hVISA.

Otros pulsotipos minoritarios fueron el C (paciente comunitario, 2003, SCCmec tipo IV, PVL -); el F (paciente hospitalizado, 2006, SCCmec tipo IV, PVL -); el I (paciente hospitalizado, 2012, SCCmec tipo III, PVL -); y el J (paciente comunitario, 2011, SCCmec tipo IV, PVL +).

Cuatro de los casos fatales se asociaron a aislamientos con pulsotipo A, SCCmec tipo IV y PVL; el restante fue pulsotipo B y subtipo B5, uno de los subtipos que no agrupó con el resto de los B (en este caso el fallecimiento no había sido atribuido a la infección por SAMR).

Tabla 14. Características fenotípicas y genotípicas de los pulsotipos y sus subtipos

PULSOTIPO / n (%)	A-A9 n= 51	B-B6 n= 19	C n= 1	D-D5 n= 13	E-E3 n= 4	F n=1	G-G1 n=2	H-H1 n=2	I n=1	J n=1	
PACIENTES HOSPITALIZADOS	2 (4)	13 (68)	0 (0)	13 (100)	4 (100)	1 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (100)	0 (0)	
PACIENTES COMUNITARIOS	49 (96)	6 (32)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	
RESISTENCIA A OTROS ANTIBIÓTICOS	CIP (6) CLO (12) GEN (6) MLS _B (39)	RIF (11) CIP (100) GEN (5) CLO (26) MLS _B (100)		RIF (92) CIP (100) GEN (100) CLO (100) MLS _B (100) SXT (100)	CIP (50) GEN (75) CLO (75) MLS _B (50)		CIP (50) GEN (50) MLS _B (50)	RIF (50) CIP (50) GEN (50) CLO (50) MLS _B (100)	CIP (100) GEN (100) MLS _B (100) SXT (100)	CIP (100) MS _B (100)	
hVISA	0 (0)	2 (11)	0 (0)	2 (15)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	
SCC_{mec}	IV 49 (96); S/T 2 (4)	II 17 (89); IV 2 (11)	IV 1 (100)	III 12 (92); IV 1 (8)	IV 2 (50); V 2 (50)	IV 1 (100)	I 1 (50); IV 1 (50)	IV 2 (100)	III 1 (100)	IV 1 (100)	
LEUCOCIDINA PANTON VALENTINE +	51 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (23)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	
TOXINA DE SINDROME DE SHOCK TÓXICO-1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
PERÍODO DE AISLAMIENTO	2003-2011	2004-2011	2003	2002	2002-2005	2006	2006-2011	2002	2012	2011	

S/T: sin tipificar

Se observó una buena correlación entre el pulsotipo, el tipo de SCC_{mec} y la presencia de PVL (Tablas 15 y 16). Como excepciones, solamente dos aislamientos con pulsotipo B presentaron SCC_{mec} tipo IV a diferencia del tipo II predominante; un aislamiento con pulsotipo D presentó SCC_{mec} tipo IV en lugar del tipo III presente en la mayoría; tres aislamientos del pulsotipo D presentaron PVL.

En el ámbito hospitalario predominaron los pulsotipos B y D, pero mientras que todos los aislamientos del pulsotipo D fueron únicamente del año 2002; el pulsotipo B se mantuvo a lo largo del período de tiempo estudiado pero con escasos aislamientos por año (Tabla 15). El resto de los aislamientos de pacientes hospitalizados presentó variedad de pulsotipos de baja frecuencia que se distribuyeron en todo el período estudiado.

En la comunidad se evidencia el predominio numérico y la perpetuación temporal del pulsotipo A (Tabla 16). Casos esporádicos del pulsotipo B se distribuyeron a lo largo del período; al igual que otros dos pulsotipos representados por una única cepa cada uno.

Tabla 15. Distribución temporal de los aislamientos de pacientes hospitalizados según pulsotipo, SCCmec y PVL. Período 2002-2012.

n=38

AÑO / n	2002	2004	2005	2006	2007	2008	2011	2012	TOTAL
A (USA1100) : IV : PVL	*	1	*	*	1	*	*	*	2
B (USA100) : II	*	2	*	*	1	2	2	*	7
B1 : IV	*	*	*	1	*	*	*	*	1
B2 : II	*	*	*	*	1	*	*	*	1
B4 : II	*	*	*	*	*	*	3	*	3
B6 : II	*	*	*	*	1	*	*	*	1
D : III	3	*	*	*	*	*	*	*	3
D : IV : PVL	1	*	*	*	*	*	*	*	1
D1: III	3	*	*	*	*	*	*	*	3
D2 : III	3	*	*	*	*	*	*	*	3
D3 : III	1	*	*	*	*	*	*	*	1
D4 : III : PVL	1	*	*	*	*	*	*	*	1
D5 : III : PVL	1	*	*	*	*	*	*	*	1
E : V	1	*	*	*	*	*	*	*	1
E1 : V	1	*	*	*	*	*	*	*	1
E2: IV	1	*	*	*	*	*	*	*	1
E3 : IV	*	*	1	*	*	*	*	*	1
F : IV	*	*	*	1	*	*	*	*	1
G : I	*	*	*	*	*	*	1	*	1
G1 : IV	*	*	*	1	*	*	*	*	1
H : IV	1	*	*	*	*	*	*	*	1
H1 : IV	1	*	*	*	*	*	*	*	1
I : III	*	*	*	*	*	*	*	1	1

Pulsotipo: SCCmec: PVL

Tabla 16. Distribución temporal de los aislamientos de pacientes comunitarios según pulsotipo, SCCmec y PVL. Período 2003-2012.

n=57

AÑO / n	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2011	2012	TOTAL
A (USA1100) : IV : PVL	11	4	1	2	6	2	*	7	*	33
A1 : IV : PVL	1	*	*	*	*	1	*	1	*	3
A1 : ST : PVL	1	*	*	*	*	*	*	*	*	1
A2 : IV : PVL	1	*	*	*	*	1	*	1	*	3
A3 : IV : PVL	1	*	*	*	*	*	1	*	*	2
A4 : IV : PVL	1	*	*	*	*	*	*	*	*	1
A5 : ST : PVL	1	*	*	*	*	*	*	*	*	1
A6 : IV : PVL	*	*	*	*	2	*	*	*	*	2
A7 : IV : PVL	*	*	*	*	*	1	*	*	*	1
A8 : IV : PVL	*	*	*	*	1	*	*	*	*	1
A9 : IV : PVL	*	*	*	*	1	*	*	*	*	1
B (USA100) : II	*	*	*	1	*	*	*	*	*	1
B (USA100) : IV	*	*	*	*	*	*	*	1	*	1
B2 : II	*	*	*	*	*	*	*	*	1	1
B3 : II	*	*	*	*	*	*	*	2	*	2
B5 : II	*	1	*	*	*	*	*	*	*	1
C : IV	1	*	*	*	*	*	*	*	*	1
J : IV : PVL	*	*	*	*	*	*	*	1	*	1

Pulsotipo: SCCmec: PVL; S/T: sin tipificar

Con los 10 pulsotipos y los 25 subtipos obtenidos se construyó un dendrograma (Figura 25).

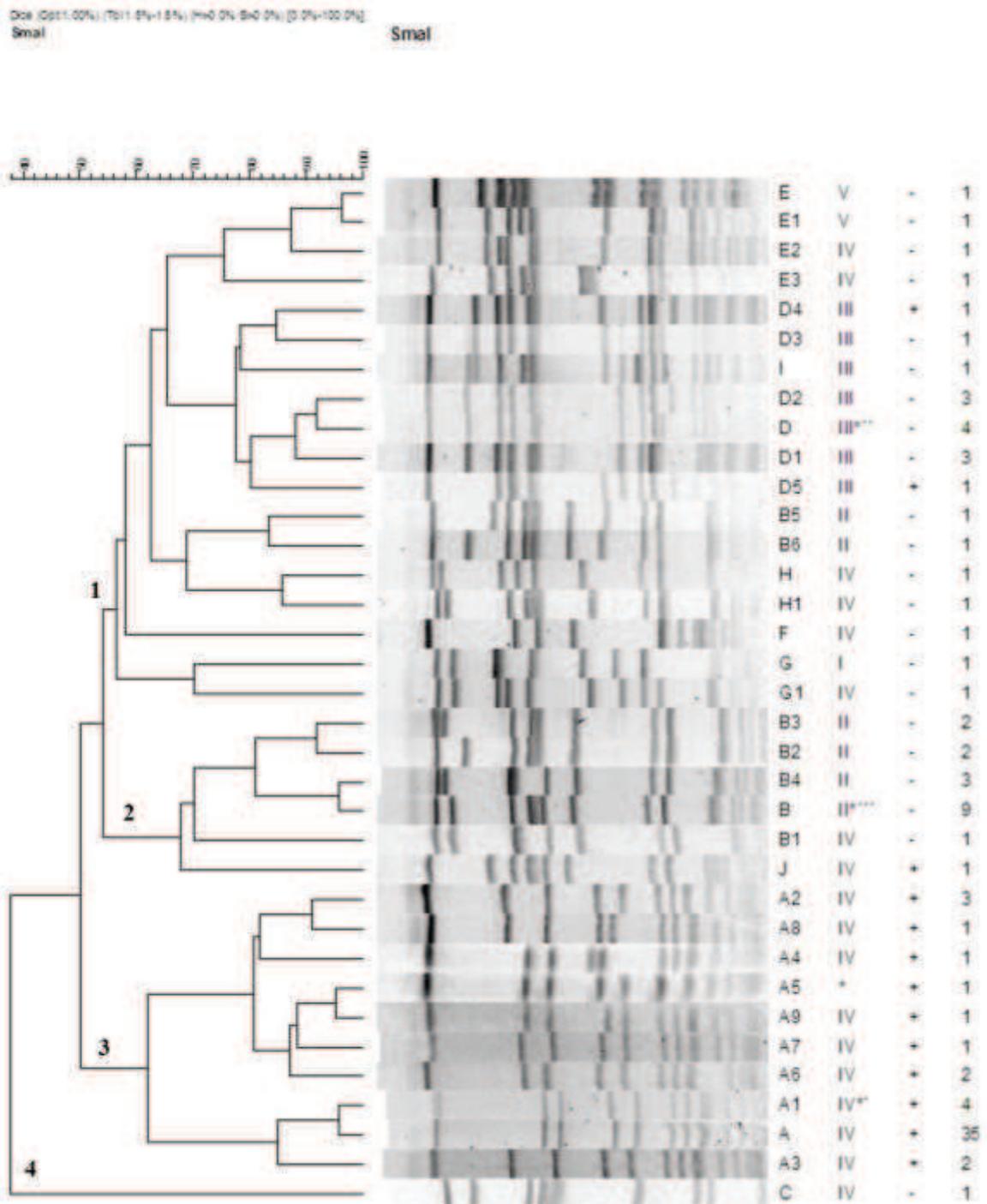


Figura 25. Dendrograma de SAMR representativos de pulsotipos y subtipos (n=35) utilizando el índice de DICE y el algoritmo UPGMA. Primera columna: pulsotipo; segunda columna: tipo SCCmec; tercera columna: PVL; cuarta columna: número de aislamientos. *: sin resultado de SCCmec; *': excepto 1 aislamiento sin resultado de SCCmec; *'': excepto 1 aislamiento con SCCmec tipo IV; *''': excepto 1 aislamiento con SCCmec tipo IV.

Se observaron 4 agrupamientos, el grupo 1 contenía la mayor parte de los aislamientos de origen hospitalario, de los pulsotipos B, D, E, F, G, H e I, en los que básicamente cada uno estaba separado de los demás. El grupo 2 contenía los pulsotipos B y J; mientras que el grupo 3 estaba compuesto exclusivamente por el pulsotipo A y sus subtipos, predominantemente de origen comunitario. El grupo 4 fue el más divergente de los otros tres y estaba constituido por una única cepa del pusotipo C.

Todos los subtipos de un mismo pulsotipo agruparon juntos en el dendrograma, excepto en el caso del pulsotipo B, cuyos subtipos se dividieron entre el grupo 1 y el grupo 2.

7- DISCUSIÓN

En este trabajo de caracterización de cepas de SAMR circulantes en la comunidad y en el hospital interesaba conocer la diversidad fenotípica y molecular del patógeno en uno y otro ámbito y su posible variación a lo largo de una década.

7.1- Aspectos epidemiológicos

La mediana de edad de los pacientes hospitalizados fue de 60 años a diferencia de los 25 años y medio de los pacientes de la comunidad. Podría haber un sesgo en el primer grupo ya que las cepas fueron principalmente del Hospital de Clínicas (población mayor de 18 años), pero cabe destacar que la mayoría de los pacientes hospitalizados tenían más de 40 años. Las cepas del grupo de pacientes comunitarios en cambio, provenían de un gran número de centros de todo el país y correspondían a pacientes de todas las edades.

La distribución de cuadros clínicos causados por SAMR-com observados en esta tesis concuerda con la bibliografía, la cual reporta un espectro de infecciones similar a las causadas por *S. aureus* meticilino sensible. Es decir, que mayoritariamente son infecciones de piel y partes blandas, especialmente forúnculos recurrentes y abscesos profundos, siendo menos comunes las infecciones invasivas, entre las que se destacan la neumonía necrosante y la sepsis. La bibliografía también documenta muchas infecciones invasivas por SAMR-com a punto de partida de un proceso de piel, especialmente si el tratamiento con antibióticos no se ajusta al perfil de resistencia del microorganismo causante (Gorwitz *et al.*, 2006).

Los casos fatales documentados en esta tesis ocurrieron en pacientes jóvenes con bacteriemia, sepsis y neumonía necrosante. Cuatro de ellos se asociaron a aislamientos con pulstipo A, SCC*mec* tipo IV y PVL. Esto coincide con los datos a nivel mundial ya que han sido reportados casos clínicos severos y fatales en pacientes jóvenes, por sepsis y neumonía necrosante, asociados a SAMR-com con PVL y compartiendo un mismo pulstipo (Minnesota Department of Health, 2004).

7.2- Susceptibilidad antimicrobiana

La heteroresistencia a OXA fue detectada en más de la mitad de las cepas de pacientes comunitarios y en una minoría de las de pacientes hospitalizados. Otros estudios también comprueban que las cepas de SAMR-com son mayoritariamente heteroresistentes a OXA (Pedreira *et al.*, 2004).

Altos valores de CIM para OXA, mayores de 256 µg/mL, se observaron en la mayoría de las cepas de los pacientes hospitalizados pero solamente en un tercio de las de los pacientes comunitarios, lo cual es esperable debido a que la presión selectiva a que son sometidas las cepas en los hospitales favorece la circulación de estos clones más resistentes.

Un porcentaje minoritario de las cepas de pacientes hospitalizados presentó fenotipo MLS_B inducible, mientras que casi todas las cepas de pacientes comunitarios con fenotipo MLS_B fueron inducibles. En contraste, el estudio del brote carcelario de 2003 reportaba 93% de resistencia a eritromicina y 77% de resistencia inducible a clindamicina (Mowszowicz *et al.* 2004). En un brote epidémico los aislamientos son idénticos o casi idénticos entre sí, ya que corresponden a una diseminación localizada y acotada en el tiempo y por lo tanto pueden pertenecer a un fenotipo que no sea el que predomina en el país. Por el contrario, nuestra colección fue recolectada en un plazo de 10 años de distintos puntos del país. De hecho, existe otro estudio (2003- 2006) de SAMR-com en Uruguay que detectó 40% de cepas con fenotipo iMLS_B, un porcentaje similar al de esta tesis (Pardo *et al.*, 2013).

La detección presuntiva de cepas con fenotipo heteroresistente de sensibilidad disminuida a vancomicina constituye un hallazgo sin antecedentes en Uruguay, que deberá ser confirmado ya que la sensibilidad del macrométodo epsilométrico para la detección de hVISA es de 89% y su especificidad del 55% (van Hal *et al.*, 2011). Nuestros resultados deberán confirmarse por análisis poblacional, que es el método considerado de referencia. De todas maneras, este hallazgo refuerza la importancia de realizar una búsqueda de estos mecanismos de resistencia de difícil detección, especialmente en pacientes sometidos a tratamientos prolongados con vancomicina.

Entre las 6 cepas hVISA, solamente una era de paciente comunitario, aunque con características particulares, ya que poseía un SCC_{mec} tipo II y era PVL negativa. Las restantes hVISA eran de pacientes hospitalizados, y presentaron variedad de perfiles, con SCC_{mec} tipo II (1/6), III (2/6) y IV (2/6). Recientemente, se han reportado en Argentina algunas cepas hVISA con SCC_{mec} tipo III y IV, asociadas tanto a SAMR-com como a

SAMR-hosp (detectadas por macrométodo elipsométrico y pre-difusión con tabletas de VAN y TEI) (Sola *et al.*, 2012).

Las cepas de pacientes hospitalizados presentaron un perfil de multiresistencia y las de pacientes comunitarios fueron mayoritariamente sensibles a antibióticos no β -lactámicos. Es decir, la mayor parte de las cepas estudiadas se ajustaban a las definiciones con criterio microbiológico que diferencian SAMR-com y SAMR-hosp por su perfil de susceptibilidad a los antibióticos. De acuerdo a esa clasificación, se comprobó que existió una diseminación discreta del clon de SAMR-com en el ambiente hospitalario. Su perfil relativamente sensible a los antibióticos no le aporta la ventaja selectiva que sí tiene SAMR-hosp, pero sus atributos especiales de virulencia (que le permiten infectar a pacientes jóvenes sin co-morbilidades) le resultan aún más efectivos para el tipo de pacientes que se encuentra en los hospitales.

7.3- Marcadores moleculares: SCCmec, PVL y PFGE

En los pacientes comunitarios se evidenció la presencia mayoritaria de cepas con SCCmec tipo IV (88%) que se ha mantenido a lo largo del período estudiado.

Los aislamientos de SAMR-com, además del SCCmec tipo IV característico, pueden poseer SCCmec tipo V, VI o VII; aunque la mayoría de los aislamientos con SCCmec tipo V son de Australia y Taiwan (Deurenberg & Stobbering, 2008). En esta tesis el SCCmec tipo V se aisló únicamente de dos pacientes hospitalizados que además presentaban un perfil de resistencia propio de SAMR-hosp.

En los pacientes hospitalizados se detectaron los SCCmec tipo I, II, III, IV y V. Los SCCmec tipo I y III se consideran marcadores moleculares distintivos de SAMR-hosp (Deurenberg & Stobbering, 2008); y en este estudio se identificaron exclusivamente en las cepas de SAMR-hosp. El SCCmec tipo II es un marcador de SAMR-hosp que también se detectó en pacientes que habían sido clasificados como de la comunidad. Estos resultados pueden ser interpretados como: a) una adaptación de algunos clones de SAMR-hosp al ambiente comunitario, b) un error de clasificación por falta de datos sobre factores de riesgo o internaciones previas.

La mayor parte de las cepas de pacientes comunitarios (88%) poseían los genes que codifican para la PVL, en coincidencia con lo reportado por otros investigadores. El porcentaje de cepas PVL positivas en los pacientes hospitalizados fue 13% en

contraposición al 5% reportado en la bibliografía (Prevost *et al.*, 1995b). Sin embargo, este porcentaje disminuye a 8% si se restan 2 cepas con características genotípicas de SAMR-com.

La asociación de la presencia de PVL al cuadro clínico es similar a la reportada previamente, mayoritariamente a forúnculos, neumonía, abscesos y celulitis (Lina *et al.*, 1999).

En todos los casos la PVL se asoció al SCCmec tipo IV excepto en dos cepas con SCCmec tipo III. Esta asociación del SCCmec tipo IV y PVL ha sido definida como un marcador molecular de SAMR-com en Estados Unidos (Shukla *et al.*, 2004). Sin embargo, esta relación no se detecta en los aislamientos de SAMR-com de Australia, Irlanda y Corea (Deurenberg & Stobbering, 2008).

También existe evidencia de cepas de SAMR-com PVL positivas con SCCmec tipos I y III en Holanda (Wannet *et al.*, 2005) y con SCCmec I y II en Corea (Jeong *et al.*, 2007).

En conclusión, es probable que cada país o región deba definir marcadores moleculares de acuerdo a su realidad epidemiológica, lo cual resalta la importancia de realizar estudios para explorar las características de las cepas circulantes. En Uruguay, tanto los resultados de estudios previos como los obtenidos en esta tesis indican que la asociación entre SCCmec tipo IV y PVL sería un marcador que comprende a la mayor parte de SAMR-com (Benoit *et al.*, 2008, Ma *et al.*, 2005).

El pulsotipo A, siempre asociado a SCCmec tipo IV identificado en esta tesis, es idéntico al perfil de PFGE denominado USA1100 del clon “Suroeste del Pacífico” (ST30, IV), originario y prevalente en Australia, distribuido actualmente en los cinco continentes (Ma *et al.*, 2005). El CDC estableció una base de datos para perfiles de PFGE definidos por una nueva nomenclatura “USA” que se asocia a los clones existentes y nombrados inicialmente según su lugar de origen.

El pulsotipo A y sus subtipos fue el mayoritario y se encontró asociado principalmente a los pacientes comunitarios (96%). Los dos pacientes hospitalarios con este pulsotipo eran pacientes sometidos a cirugías lo cual plantea dos posibilidades: a) eran pacientes que ya ingresaron infectados o colonizados o b) adquirieron SAMR en el hospital. La segunda posibilidad estaría sustentada por un estudio previo en el que se documentaba la transmisión nosocomial de SAMR-com en Uruguay en el período 2002-2004 (Benoit *et al.*, 2008).

El pulsotipo B presentó un perfil de bandas idéntico al perfil PFGE USA100 que corresponde al clon hospitalario New York/Japón con secuenciotipo ST5 por MLST y

SCC*mec* II. Este clon resulta prevalente entre SAMR-hosp de Estados Unidos y se distribuye en Japón, Europa y en América específicamente en México y Uruguay (Deurenberg & Stobberingh, 2008).

En esta tesis las cepas del pulsotipo B fueron detectadas mayoritariamente en el hospital (68%). Los casos detectados en la comunidad correspondían a infecciones de piel y bacteriemia en pacientes adultos. No se descarta que fuesen pacientes con contactos previos recientes con el sistema de salud, especialmente en el caso de dos pacientes de 81 y 87 años.

El pulsotipo D fue encontrado solamente en las cepas de origen hospitalario con SCC*mec* tipo III, excepto una de tipo IV. Este pulsotipo y subtipos ya habían sido identificados como los únicos presentes en un estudio previo en Uruguay (1996-1998) y corresponden al clon brasilero (Aires de Sousa *et al.*, 2001). Los aislamientos de este pulsotipo solamente fueron identificados en 2002, lo que sugiere que este clon está siendo sustituido por otros. En Argentina, el clon cordobés ha reemplazado a los clones brasilero y pediátrico que circulaban predominantemente (Sola *et al.*, 2002); lo mismo ha ocurrido en Chile con la sustitución de una variante del clon brasilero por el clon cordobés (también llamado cordobés/chileno) (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2010).

Las cepas con pulsotipo D presentaron alto porcentaje de multiresistencia que incluía trimetoprim/sulfametoxazol, al igual que las cepas circulantes entre 1996-1998. Tres de ellas tenían PVL y dos fueron hVISA, probablemente como resultado de eventos genéticos independientes.

Una mayor susceptibilidad a los antibióticos de las cepas hospitalarias posteriores a 2002, especialmente al trimetoprim/sulfametoxazol, ya sugerían que el clon brasilero podía estar siendo sustituido por uno o más nuevos clones y efectivamente en esta tesis se identificó la presencia de otros pulsotipos. Entre ellos, el pulsotipo E que no pudo ser relacionado a ningún clon ya descrito, con SCC*mec* IV y V, sensible a SXT y formando un único agrupamiento en el dendrograma. Estas cepas deberán ser caracterizadas por MLST para explorar sus relaciones genéticas con los complejos conocidos.

También se identificó al pulsotipo G, representado por 2 cepas sensibles a SXT, una de ellas con SCC*mec* tipo I, con un patrón de bandas similar al clon cordobés. En Argentina en el año 2002, se describió la emergencia de este nuevo clon, definido como ST5, complejo clonal CC5 por MLST, con SCC*mec* I y mayor susceptibilidad a los antibióticos incluido SXT (Sola *et al.*, 2002).

Una hipótesis que se manejó para esta tesis era que en Uruguay se podría haber generado una situación epidemiológica similar a la de Argentina y Chile; los resultados obtenidos confirman una diseminación incipiente del clon cordobés.

8- CONCLUSIONES

- La caracterización fenotípica y molecular de las cepas permitió dilucidar la circulación de los distintos clones en los ámbitos comunitario y hospitalario. La clasificación de las cepas en base a los datos epidemiológicos disponibles coincidió, en la mayor parte de los casos, con la definición molecular que distingue SAMR-com de SAMR-hosp.
- En los pacientes comunitarios, la mayoría de las infecciones por SAMR fueron de piel y partes blandas y la mediana de edad fue de 25 años y medio. En los pacientes hospitalizados la mayoría de las infecciones fueron invasivas y la mediana de edad fue de 60 años.
- Las cepas de SAMR de pacientes hospitalizados mostraron un alto porcentaje de resistencia a múltiples antibióticos, incluido el fenotipo MLS_B constitutivo, a diferencia de las de pacientes comunitarios que mostraron mayor porcentaje de sensibilidad y fenotipo MLS_B inducible.
- Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a vancomicina de acuerdo a los procedimientos estándar, pero se detectaron 6 cepas hVISA por método de tamizaje.
- En la comunidad se comprobó la presencia mayoritaria de cepas de SAMR-com con perfil PFGE USA1100, SCC_{mec} tipo IV, PVL, susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos y un tercio con fenotipo iMLS_B. También se identificaron algunas cepas del clon hospitalario USA100, SCC_{mec} tipo II, y sin PVL, que probablemente correspondan a pacientes con contacto reciente con el sistema de salud
- En el hospital se detectó el pulsotipo D, que corresponde al clon brasilero, con perfil de multiresistencia a los antibióticos incluido SXT, SCC_{mec} tipo III y sin PVL. Este clon está aparentemente siendo sustituido por otros más sensibles: pulsotipo B, que corresponde al clon New York/Japón, otro pulsotipo E y el clon

cordobés, que aún está pobremente representado entre las cepas de SAMR de Uruguay.

- Todos los casos fatales ocurrieron en infecciones adquiridas en la comunidad, siendo 4 de ellos por aislamientos de SAMR-com del tipo predominante.
- La puesta a punto de las metodologías descritas en esta tesis han contribuido a la consolidación de las herramientas para reforzar la vigilancia de *S. aureus* en nuestro laboratorio de referencia nacional.

9- PERSPECTIVAS

- Aplicar la metodología desarrollada para monitorear futuros cambios epidemiológicos de las infecciones causadas por este microorganismo de manera de estar alerta ante la eventualidad de posibles brotes.
- Realizar un entrenamiento y poner a punto la técnica de análisis poblacional (PAP-AUC) para la confirmación de hVISA, ya que en esta tesis se obtuvo como resultado preliminar la presencia de cepas con este fenotipo. La implementación de esta técnica en el laboratorio constituye una meta a concretarse en el corto plazo debido a la importancia de la vancomicina en el tratamiento de las infecciones severas por *S. aureus*.
- Realizar MLST a cepas representativas de los distintos pulsotipos y sus subtipos, especialmente de los presentes en el hospital, para complementar la información obtenida y contribuir a la base de datos internacional.
- Realizar una publicación de los resultados de la tesis, así como también un informe a las autoridades del Ministerio de Salud Pública.

10- REFERENCIAS

- Aires de Sousa, M. & M. H. de Lencastre, (2004) Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *Immunol Med Microbiol* **40**: 101-111.
- Aires de Sousa, M. M. Miragaia, I. Santos Sanchez, S. Avila, I. Adamson & S.T. Casagrande (2001). Three-Year assesment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J Clin Microb.* **39**: 2197-2205.
- Archer, G. L., (1998) *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* **26**: 1179-1181.
- Archer, G. L., D. M. Niemeyer, J. A. Thanassi & M. J. Pucci, (1994) Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 447-454.
- Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, W. Yuzawa, K. Aoki, & A. Oguchi, (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**: 1791-1792.
- Bannerman, T. L., (2003) *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalasa-positive cocci that grow aerobically. In: Manual of Clinical Microbiology. M. P.R. (ed). pp. 384-404.
- Benoit, S. R., C. Estivariz, C. Mogdasy, W. Pedreira, A. Galiana & H. Bagnulo, (2008) Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. *Emerg Infect Dis* **14**: 1216-1223.
- Blomster-Hautamaa, D. A., B. N. Kreiswirth, J. S. Kornblum, R. P. Novick & P. M. Schlievert, (1986) The nucleotide and partial amino acid sequence of toxic shock syndrome toxin-1. *J Biol Chem* **261**: 15783-15786.
- Camou, T., (2004) Epidemia de SAMR comunitario en Uruguay. In: Reunión Perú.
- Chambers, H. F. & F. R. Deleo, (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7**: 629-641.
- Chen, L., J. R. Mediavilla, D. C. Oliveira, B. M. Willey, H. de Lencastre & B. N. Kreiswirth, (2009) Multiplex real-time PCR for rapid *Staphylococcal* cassette chromosome mec typing. *J Clin Microbiol* **47**: 3692-3706.
- Chung, M., H. de Lencastre, P. Matthews, A. Tomasz, I. Adamsson, & M. A. d. Sousa, (2000) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* **6**: 189-198.
- Clinical and Laboratory Standrs Institut (2013) Performance Standrs for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third International Supplement. In: CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standrs Institut.
- Davis K.A., J. J. S., H. K. Crouch, C. E. Florez, & D.r. Hospenthal, (2004) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Nares Colonization at Hospital Admission and Its Effect on Subsequent MRSA Infection *Clin Infect Dis* **39**: 776-782.
- Departamento de Laboratorios de Salud Pública (2013) In: www.msp.gub.uy/ucepidemiología.
- Deresinski, S., (2008) Antistaphylococcal vaccines and immunoglobulin therapies. In: 12th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Australia.

- Deurenberg, R. H. & E. E. Stobberingh, (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* **8**: 747-763.
- Deurenberg, R. H., C. Vink, S. Kalenic, A. W. Friedrich, C.A. Bruggeman & E.E. Stobberingh, (2007) The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* **13**: 222-235.
- Diep, B. A., S. R. Gill, R. F. Chang, T. H. Phan, H. Chen & M. G. Davidson, (2006) Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367**: 731-739.
- Dryden, M. S., (2010) Complicated skin and soft tissue infection. *J Antimicrob Chemother* **65 Suppl 3**: iii35-44.
- Enright, M. C., D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann & B. G. Spratt, (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7687-7692.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2013). In: www.ecdc.europa.eu (ed).
- Fowler, V. G., K. B. Allen, E. D. Moreira, M. Moustafa, F. Isgro & H. W. Boucher, (2013) Effect of an investigational vaccine for preventing *Staphylococcus aureus* infections after cardiothoracic surgery: a randomized trial. *JAMA* **309**: 1368-1378.
- Galiana, A., (2003) Infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. *Arch Pediatr Uru* **74**: 26-29.
- Galiana, A., W. Pedreira, K. Hiramatsu, X.X. Ma, T. Ito, & O. Bertaux, (2004) Seis casos fatales de SAMR-com en Uruguay. In: ECCMID. Praga.
- Gardella, N., S. Murzicato, S. Di Gregorio, A. Cuirolo, J. Desse & F. Crudo *et al.*,(2011). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina. *Infect Genet Evol* **11**: 1066-1071.
- Gordon, R. J. & F. D. Lowy, (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **46 Suppl 5**: S350-359.
- Gorwitz, R., D.B. Jernigan, J.H. Powers & JA. Jernigan, (2006) Strategies for Clinical Management of MRSA in the Community: Summary of an Experts. In: Centers for Disease Control and Prevention, pp. 1-12.
- Groom, A. V., D. H. Wolsey, T. S. Naimi, K. Smith, S. Johnson & D. Boxrud, (2001) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA* **286**: 1201-1205.
- Hanssen A-M. & J. U. Ericson Sollid, (2006) SCCmec in staphylococci: genes on the move. *Immunol Med Microbiol* **46**: 8-20.
- Hartman, B. & A. Tomasz, (1981) Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **19**: 726-735.
- Holden, M. T., E. J. Feil, J. A. Lindsay, S. J. Peacock, N. P. Day & M. C. Enright (2004) Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9786-9791.
- Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn & K. Hiramatsu, (2001) Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1323-1336.
- Ito, T., Y. Katayama & K. Hiramatsu, (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1449-1458.

- Ito, T., K. Kuwahara-Arai, Y. Katayama, Y. Uehara, X. Han, Y. Kondo & K. Hiramatsu, (2014) Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Analysis of MRSA. *Methods Mol Biol* **1085**: 131-148. Aceptado para publicación.
- Jeong, H. Y., J. E. Lee, B. K. Choi, K. W. Seo, S. H. Park, Y & L. Kim (2007) Molecular epidemiology of community-associated antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* in Seoul, Korea (2003): pervasiveness of multidrug-resistant SCCmec type II methicillin-resistant *S. aureus*. *Microb Drug Resist* **13**: 178-185.
- Johnson, W. M., S. D. Tyler, E. P. Ewan, F. E. Ashton, D. R. Pollard & K. R. Rozee, (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**: 426-430.
- Kaneko, J., T. Kimura, Y. Kawakami, T. Tomita & Y. Kamio., (1997) Panton-Valentine leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC49775). *Biosci Biotechnol Biochem* **61**: 1960-1962.
- Katayama, Y., T. Ito & K. Hiramatsu, (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1549-1555.
- Katayama, Y., T. Ito & K. Hiramatsu, (2001) Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1955-1963.
- Kim, E. S., J. S. Song, H. J. Lee, P. G. Choe, K. H. Park & J. H. Cho (2007) A survey of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Antimicrob Chemother* **60**: 1108-1114.
- Klevens, R. M., J. R. Edwards, C. L. Richards, Jr., T. C. Horan, R. P. Gaynes, D. A. Pollock & D. M. Cardo, (2007) Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep* **122**: 160-166.
- Klevens, R. M., M. A. Morrison, S. K. Fridkin, A. Reingold, S. Petit & K. Gershman, (2006) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg Infect Dis* **12**: 1991-1993.
- Kluytmans, J., A. van Belkum & H. Verbrugh, (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* **10**: 505-520.
- Kreiswirth, B., J. Kornblum, R. D. Arbeit, W. Eisner, J. N. Maslow & A. McGeer (1993) Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* **259**: 227-230.
- Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa & I. Kobayashi (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**: 1225-1240.
- Laurent, F., H. Chardon, M. Haenni, M. Bes, M. E. Reverdy & J. Y. Madec (2012) MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. *Emerg Infect Dis* **18**: 1465-1467.
- Lina, G., Y. Piemont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter & V. Gauduchon (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* **29**: 1128-1132.
- López, F. A. & C. V. Sanders, (2004) Infecciones cutáneas y de partes blandas. In: Enfermedades Infecciosas. Marbán (ed). Madrid, pp. 106-137.
- Lowy, F. D., (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**: 520-532.

- Lowy, F. D., (2011) How *Staphylococcus aureus* adapts to its host. *N Engl J Med* **364**: 1987-1990.
- Ma X.X., A. Galiana, W. Pedreira, M. Mowszowicz, I. Christophersen & S. Machiavello, (2005) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. *Emerg Infect Dis* **11**: 973-976.
- Minnesota Department of Health, (2004) Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota. *Disease Control Newsletter* **32**: 61-72.
- Mowszowicz M., W. Pedreira, A. Galiana, K. Hiramatsu, X.X. Ma & T. Ito, (2004) Efficacy of co-trimoxazol-high dosage short course (SXT-HDSC) in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) outbreak in Uruguay jails 2003. In: Internat Congress Infect Dis. Mexico.
- Naimi, T. S., K. H. LeDell, D. J. Boxrud, A. V. Groom, C. D. Steward & S. K. Johnson (2001) Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. *Clin Infect Dis* **33**: 990-996.
- Naimi, T. S., K. H. LeDell, K. Como-Sabetti, S. M. Borchardt, D. J. Boxrud & J. Etienne, (2003) Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* **290**: 2976-2984.
- Ogston, A., (1882) Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol* **17**: 24-58.
- Okuma, K., K. Iwakawa, J. D. Turnidge, W. B. Grubb, J. M. Bell & F. G. O'Brien (2002) Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* **40**: 4289-4294.
- Oliveira, D. C. & H. de Lencastre, (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2155-2161.
- Organización Panamericana de la Salud (2003-2008) Informe anual regional de los países participantes en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos In: OPS (ed). Washington.
- Pardo, L., M. Vola, M. Macedo-Viñas, V. Machado, D. Cuello & M. Mollerach, (2013). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children treated in Uruguay. *J Infect Dev Ctries* **7**: 10-16.
- Peacock, S. J., C. E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story & K. Mackie, (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **70**: 4987-4996.
- Pedreira W.,I. Christophersen,S. Benaderet, W. Vicentino, M. Ximenez & M. Alves,(2004) Reliability of Cefoxitin 10mcg Disk to Separate Methicillin Susceptible (MSSA) and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). A Collaborative Study. Abstracts. International Journal of Infectious Diseases. pp.130. Cancún.
- Pishchany, G., A. L. McCoy, V. J. Torres, J. C. Krause, J. E. Crowe, Jr., M. E. Fabry & E. P. Skaar, (2010) Specificity for human hemoglobin enhances *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe* **8**: 544-550.
- Ploy, M. C., C. Grelaud, C. Martin, L. de Lumley & F. Denis, (1998) First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* **351**: 1212.
- Prevost, G., P. Couppie & H. Monteil, (2003) Staphylococcal epidermolysins. *Curr Opin Infect Dis* **16**: 71-76.
- Prevost, G., P. Couppie & P. Prevost., (1995b) Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* **42**: 237-245.
- Prevost, G., B. Cribier, P. Couppie, P. Petiau, G. Supersac & V. Finck-Barbancon, (1995a) Panton-Valentine Leucocidin and Gamma-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*
-

- ATCC49775 Are Encoded by Distinct Genetic Loci and Have Different Biological Activities. *Infect Immun* **63**: 4121-4129.
- Prevost, G., G. Supersac & D. Colin., (1994) The new family of leucotoxins from *Staphylococcus aureus*: structural and biological properties In: Freer J, Aitken R, Alouf JE, eds. *Zentralbl Bakteriell Suppl* 24. 284-93.
- Proctor, R. A., (2012) Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine? *Vaccine* **30**: 2921-2927.
- Robinson, D. A., A. M. Kearns, A. Holmes, D. Morrison, H. Grundmann & G. Edwards (2005) Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet* **365**: 1256-1258.
- Rodríguez-Noriega, E., C. Seas, M. Guzmán-Blanco, C. Mejía, C. Alvarez & L. Bavestrello, (2010) Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis* **14**:e560-e566.
- Rossi F., C. Arias, (2013) XIII Workshop de Resistencia Bacteriana. Primer aislamiento de MRSA Vancomicina Resistente en Latinoamérica. In: Carta Abierta a la Comunidad Médica y Científica de Asociación Colombiana de Infectología, pp. 1-4.
- Satola, S. W., M. M. Farley, K. F. Anderson & J. B. Patel, (2011) Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *J Clin Microbiol* **49**: 177-183.
- See, R. H. & A. W. Chow, (1989) Microbiology of toxic shock syndrome: overview. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 1**: S55-60.
- Shore, A. C., E. C. Deasy, P. Slickers, G. Brennan, B. O'Connell & S. Monecke, (2011) 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* **55**: 3765-3773.
- Shukla, S.K., M.E. Stemper, S.V. Ramaswamy, S.V. Conradt, J.M. Reich & E. A. Graviss (2004). Molecular characteristics of nosocomial and native american community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. *J Clin Microbiol.* **42**: 3752-3757.
- Sieradzki, K., M.G. Pinho, & A. Tomasz, (1999) Inactivated *pbp4* in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **274**: 18942-18946.
- Sola, C., G. Gribaudo, A. Vindel, L. Patrino & J. L. Bocco, (2002) Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *J Clin Microbiol* **40**: 1427-1435.
- Sola, C., H. Paganini, A. L. Egea, A.J. Moyano, A. Garnero & I. Kevric (2012). Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinean children. *PLoS ONE.* **7**: 1-12.
- Steward, C. D., P. M. Raney, A. K. Morrell, P. P. Williams, L. K. McDougal & L. Jevitt (2005) Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**: 1716-1721.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing & B. Swaminathan, (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**: 2233-2239.

- Tristan, A., M. Bes, H. Meugnier, G. Lina, B. Bozdogan & P. Courvalin (2007) Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis* **13**: 594-600.
- Tsubakishita, S., K. Kuwahara-Arai, T. Sasaki & K. Hiramatsu, (2010) Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 4352-4359.
- Udo, E. E., J. W. Pearman & W. B. Grubb, (1993) Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect* **25**: 97-108.
- van Hal, S.J., M.C. Wehrhahn, T. Barbogiannakos, J.Mercer, D. Chen & D.L. Paterson, (2011) Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* **49**: 1489-1494.
- Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo & H. Heffernan (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* **9**: 978-984.
- Wannet W.J., E. Spalburg, M.E. Heck, G.N. Pluister, E. Tiemersma & R.J Willems (2005). Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Pantone-Valentine leukocidin genes in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* **43**: 3341-3345.
- Wertheim, H. F., D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh & J. L. Nouwen, (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **5**: 751-762.
- Wielders, C. L., M. R. Vriens, S. Brisse, L. A. de Graaf-Miltenburg, A. Troelstra & A. Fler, (2001) In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet* **357**: 1674-1675.
- Winn, W. C., S. D. Allen, W. M. Janda, E. W. Koneman, G. W. Procop, P. C. Schrenckenberger & G. L. Woods, (2008) Koneman: Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color (6ta ed.) Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, p. 1696.
- Wu, S. W., H. de Lencastre & A. Tomasz, (2001) Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**: 2417-2424.
- Zhang, K., J. A. McClure, S. Elsayed, T. Louie & J. M. Conly, (2005) Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**: 5026-5033.

**ANEXO I
CEPAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**

CEPA	FECHA	INSTITUCIÓN	CUADRO CLÍNICO	MUESTRA	SEXO	EDAD	CAT/COA/ADN	RESIST. POR DO
SHC 02.02	24/04/2002	H. Clínicas	Bacteriemia por catéter	Hemocultivo		70	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 08.02	30/04/2002	H. Clínicas	Herida quirúrgica	Ex. de herida quirúrgica		52	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 11.02	30/04/2002	H. Clínicas	Bacteriemia foco piel	Hemocultivo		45	pos/pos/pos	FOX, GEN, CLO, PEN
SHC 16.02	13/05/2002	H. Clínicas	Bacteriemia por catéter	Hemocultivo		77	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 17.02	13/05/2002	H. Clínicas	Bacteriemia por catéter	Hemocultivo		77	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 23.02	30/05/2002	H. Clínicas	Herida de piel	Ex. de piel		21	pos/pos/pos	FOX, GEN, CLO, PEN, QIP ₅₀
SHC 27.02	02/06/2002	H. Clínicas	Sepsis	Lavado bronquioalveolar		52	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF
SHC 30.02	06/06/2002	H. Clínicas	Bacteriemia sin foco	Hemocultivo		49	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 46.02	15/06/2002	H. Clínicas	Neumonía	Hemocultivo		85	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN
SHC 47.02	15/06/2002	H. Clínicas	Bacteriemia por catéter	Hemocultivo		58	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF
SHC 55.02	03/07/2002	H. Clínicas	Herida quirúrgica			55	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 56.02	03/07/2002	H. Clínicas	Bacteriemia por catéter	Hemocultivo		64	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 94.02	31/07/2002	H. Clínicas	Bacteriemia por catéter	Hemocultivo		56	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 109.02	20/08/2002	H. Clínicas	Herida quirúrgica	Ex. de herida quirúrgica		68	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 119.02	28/08/2002	H. Clínicas	Endocarditis	Catéter		70	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT, RIF ₅₀
SHC 129.02	05/09/2002	H. Clínicas	Sepsis	Hemocultivo		16	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN, SXT
SHC 166.02	10/10/2002	H. Clínicas	Bacteriemia foco piel	Hemocultivo		47	pos/pos/pos	FOX, QIP, GEN, CLO, PEN
SHC 222.02	28/11/2002	H. Clínicas	Endocarditis	Hemocultivo		22	pos/pos/pos	FOX, PEN, RIF
S 17.04	16/08/04	CASMU	Bacteriemia	Hemocultivo	M	82	pos/pos/pos	FOX, QIP, PEN, CLO ₅₀
S 18.04	16/08/04	CASMU	Neumonía nosocomial	Aspirado traqueal	F	sd	pos/pos/pos	FOX, QIP, PEN, CLO
Sau 05.04	17/08/2004	H. Clínicas	Sepsis postcesárea	Hemocultivo	F	32	pos/pos/pos	FOX, PEN, CLO
Sau 18.05	02/06/2005	H. Clínicas	Absceso pélvico. Fístula recto- vagina- vesical (radioterapia)		F	82	pos/pos/pos	FOX, PEN
Sau 40.06	14/07/2006	MJCAM	Diálisis/bacteriemia	Hemocultivo	F	65	pos/pos/pos	FOX, PEN
Sau 47.06	12/09/2006	H. Evangélico	Bacteriemia	Hemocultivo	M	67	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP
Sau 50.06	03/11/2006	H. Clínicas	Sepsis	Hemocultivo	M	74	pos/pos/pos	FOX, PEN
Sau 58.07	20/03/2007	H. Evangélico	Paciente en diálisis/ bacteriemia	Hemocultivo	M	66	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP
Sau 65.07	27/04/2007	F. Nac. Recursos	Herida de cirugía cardíaca	Ex. de herida quirúrgica	M	Adulto	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP, GEN
Sau 82.07	17/10/2007	F. Nac. Recursos	Herida de cirugía cardíaca (esternotomía y safenectomía)	Ex. de herida de safenectomía	F	60	pos/pos/pos	FOX, PEN
Sau 87.07	15/11/2007	H. Evangélico	Infección por catéter	Catéter	M	Adulto	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP
Sau 98.08	27/07/2008	H. Evangélico	Neumonía intrahospitalaria	Secreciones traqueales	M	74	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP, CLO
Sau 101.08	19/08/2008	H. Clínicas	Infección intradiálisis; paciente renal crónico	Líquido peritoneal	M	47	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP, CLO
Sau 107.11	04/03/11	H. Clínicas	Infección post-operatoria (neurocirugía)		F	50	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP, GEN ₅₀
Sau 114.11	14/03/11	H. Clínicas	Hematuria	Urocultivo	M	87	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP
Sau 121.11	21/03/11	H. Clínicas	Paciente en diálisis. Infección de orificio de catéter peritoneo	Ex. de orificio de catéter	F	38	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP
Sau 124.11	29/03/11	H. Clínicas	Transplantado renal	Ex. nasal	F	39	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP
Sau 125.11	29/03/11	H. Clínicas	Espondilodisitis Shock séptico	Hemocultivo	F	63	pos/pos/pos	FOX, PEN, RIF, QIP
Sau 131.12	23/02/12	H. Florida	Neumonía	Líquido pleural	F	31	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP
Sau 138.12	06/06/12	H. Clínicas	Bacteriemia	Hemocultivo	M	72	pos/pos/pos	FOX, PEN, QIP, GEN, SXT

ANEXO I
CEPAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

CEPA	CLI POR DD	ERI POR DD	CIM CLI (µg/mL)	CIM ERI (µg/mL)	CIM OXA (µg/mL)	CIM VAN (µg/mL)	MACROMÉTODO (VAN/TE)	TAM. OXA	PVL	TSST-1	SCC _{mec}	PUL SOTIPO
SHC 02.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	2 S	(4/8) VSSA	positivo	positivo	negativo	II	D5
SHC 08.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R	2 S	(4/8) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	D1
SHC 11.02	24 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	>256 R	2 S	(8/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	V	E
SHC 16.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	>256 R	>256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	D2
SHC 17.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	D2
SHC 23.02	23 R IND. Fenot D+	6 R	0,064	> 256 R	16 R	2 S	(4/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	V	E1
SHC 27.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R	2 S	(4/8) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	D1
SHC 30.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R	2 S	(8/8) IVISA	positivo	positivo	negativo	II	D4
SHC 46.02	26 S	28 S	N/C	N/C	8 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	IV	E2
SHC 47.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	>256 R	>256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	D1
SHC 55.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	D
SHC 56.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	D
SHC 94.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	D3
SHC 109.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R	2 S	(4/8) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	D2
SHC 119.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	>256 R	>256 R	2 S	(4/8) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	D
SHC 129.02	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R	2 S	(8/8) IVISA	positivo	negativo	negativo	II	D
SHC 166.02	23 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	>256 R	8 R	2 S	(4/8) VSSA	positivo	negativo	negativo	IV	H
SHC 222.02	25 R IND. Fenot D+	6 R	0,064 S	> 256 R	128 R	2 S	(8/8) IVISA	positivo	negativo	negativo	IV	H1
S 17.04	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	128 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	B
S 18.04	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	B
Sau 05.04	6 R Fenot R	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 18.05	26 S	25 S	N/C	N/C	64 R	2 S	(4/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	IV	E3
Sau 40.06	29 S	25 S	N/C	N/C	4 R	1 S	N/C	positivo	negativo	positivo	IV	F
Sau 47.06	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	128 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	IV	B1
Sau 50.06	28 S	27 S	N/C	N/C	> 256 R	2 S	(8/8) IVISA	positivo	negativo	negativo	IV	G1
Sau 58.07	6 R Fenot R	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	2 S	(8/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	B6
Sau 65.07	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	B2
Sau 82.07	21 S	25 S	N/C	N/C	96 R	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 87.07	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	2 S	(4/8) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	B
Sau 98.08	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	>256 R	> 256 R	2 S	(8/8) IVISA	positivo	negativo	negativo	II	B
Sau 101.08	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	2 S	(4/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	B
Sau 107.11	6 R Fenot R	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	I	G
Sau 114.11	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	128 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	B
Sau 121.11	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	2 S	(4/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	B4
Sau 124.11	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	2 S	(4/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	B4
Sau 125.11	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	2 S	(8/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	B4
Sau 131.12	6 R Fenot HD	6 R	>256 R	> 256 R	32 R	2 S	(4/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	B
Sau 138.12	6 R Fenot R	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	I

ANEXO I
CEPAS DE PACIENTES COMUNITARIOS

CEPA	FECHA	INSTITUCIÓN	CUADRO CLÍNICO	MUESTRA	SEXO	EDAD	CA T/COA/ADN
S 2.03	01/02/03	CASMU	Forunculosis recurrente	Ex. de forúnculo	F	20	pos/pos/pos
SHP 03.03	03/04/2003	HPR	Absceso cutáneo inguinal	Ex. de absceso		Niño	pos/pos/pos
SHP 04.03	03/04/2003	HPR	Lesiones cutáneas	Ex. de lesión		3 meses	pos/pos/pos
S 3.03	07/05/03	H. Maciel	IPPD. Sepsis. Fallece	Hemocultivo	F	38	pos/pos/pos
S 4.03	28/05/03	COMCAR	IPPD	Ex. de forúnculo	M	22	pos/pos/pos
S 5.03	28/05/03	COMCAR	IPPD	Ex. de forúnculo	M	25	pos/pos/pos
S 6.03	17/06/03	CASMU	Celulitis		M	RN	pos/pos/pos
S 7.03	04/07/03	H. Maciel	Neumonía necrosante comunitaria. Fallece	Hemocultivo	F	16	pos/pos/pos
SHP 05.03	08/07/2003	HPR	Absceso cutáneo	Ex. de absceso		Niño	pos/pos/pos
SHP 06.03	08/07/2003	HPR	Forúnculo	Ex. de forúnculo		6	pos/pos/pos
SHP 08.03	15/07/2003	HPR	Absceso cutáneo	Punción		Adulto	pos/pos/pos
SHP 11.03	15/07/2003	HPR	Lesión de piel	Ex. de piel		Niño	pos/pos/pos
SHP 13.03	15/07/2003	HPR	Lesión MSD	Ex. de lesión		Niño	pos/pos/pos
SHP 14.03	15/07/2003	HPR	Absceso cutáneo	Ex. de absceso		21	pos/pos/pos
SHP 19.03	22/07/2003	L. Martínez Prado				Adulto	pos/pos/pos
SHP 20.03	22/07/2003	CIMA	Absceso cutáneo	Ex. de absceso		Adulto	pos/pos/pos
S 9.03	24/08/03	H. Evangélico	Forunculosis recurrente	Ex. de forúnculo	M	40	pos/pos/pos
S 10.03	07/11/03	H. Maciel	IPPD. Sepsis. Fallece	Hemocultivo	M	15	pos/pos/pos
S 13.04	12/07/04	CASMU	Neumonía aguda y empiema, embolismo múltiple		M	39	pos/pos/pos
S 14.04	09/08/04	CASMU	Forunculosis recurrente	Ex. de forúnculo	M	20	pos/pos/pos
S 19.04	16/08/04	H. Filtro	Forunculosis recurrente	Ex. de piel	F	35	pos/pos/pos
Sau 02.04	17/08/2004	H. San José	Fallece, no atribuido SAMR. Alcohólico, indigente	Hemocultivo	M	Adulto	pos/pos/pos
Sau 13.04	29/10/2004	H. Clínicas	Múlt. consultas, 2 meses fiebre	Hemocultivo	F	33	pos/pos/pos
Sau 23.05	24/06/2005	MUCAM	Bacteriemia	Hemocultivo	M	7 meses	pos/pos/pos
Sau 34.06	16/01/2006	H. Paysandú	Neumonía	Líquido pleural		14	pos/pos/pos
Sau 42.06	19/07/06	H. Evangélico	Lesión de talón	Ex. de lesión	F	87	pos/pos/pos
Sau 43.06	25/07/2006	MUCAM	Bacteriemia	Hemocultivo	M	24 días	pos/pos/pos
Sau 60.07	29/03/2007	H. Evangélico	Forúnculo de axila	Ex. de forúnculo	F	24	pos/pos/pos
Sau 63.07	16/04/2007	H. Evangélico	Forúnculo de rodilla	Ex. de forúnculo	M	20	pos/pos/pos
Sau 64.07	17/04/2007	H. Evangélico	Absceso cutáneo pierna	Ex. de absceso	M	27	pos/pos/pos
Sau 66.07	30/04/2007	H. Evangélico	Lesión de muslo	Ex. de lesión	F	37	pos/pos/pos
Sau 67.07	23/05/2007	H. Evangélico	Lesión de piel	Ex. de lesión	F	43	pos/pos/pos
Sau 68.07	31/05/2007	H. Evangélico	Herida abdominal	Ex. de herida	M	67	pos/pos/pos
Sau 72.07	20/06/2007	H. Evangélico	Herida de pie	Ex. de herida	M	17	pos/pos/pos
Sau 76.07	01/08/2007	H. Evangélico	Lesión inguinal	Ex. de lesión	M	17 días	pos/pos/pos
Sau 84.07	13/11/2007	H. Evangélico	Lesión de piel	Ex. de lesión	F	62	pos/pos/pos
Sau 86.07	16/11/2007	H. Evangélico	Neumonía	Secr. traqueales	F	12	pos/pos/pos
Sau 90.08	18/02/2008	H. Evangélico	Absceso cutáneo axila	Ex. de absceso	F	26	pos/pos/pos
Sau 91.08	27/03/2008	H. Fray Bentos	Lesión de piel	Ex. de lesión	F	38	pos/pos/pos
Sau 92.08	24/04/2008	H. Evangélico	Lesión de axila	Ex. de lesión	M	24	pos/pos/pos
Sau 94.08	12/06/2008	H. Evangélico	Celulitis	Ex. de herida	M	20	pos/pos/pos
Sau 99.08	29/07/2008	H. Pasteur	Sepsis (absceso en dorso)	Hemocultivo	F	16	pos/pos/pos
Sau 103.09	14/08/09	HPR	Neumonía	Hemocultivo	F		pos/pos/pos
Sau 108.11	04/03/11	H. Clínicas	Úlcera cornea izquierda	Ex. de herida	M	Adulto	pos/pos/pos
Sau 109.11	04/03/11	H. Clínicas	Absceso cutáneo	Ex. de absceso	F	27	pos/pos/pos
Sau 110.11	04/03/11	H. Clínicas	Herida de rodilla	Ex. de herida	M	15	pos/pos/pos
Sau 113.11	14/03/11	H. Clínicas	Absceso cutáneo antebrazo	Líquido absceso	M	43	pos/pos/pos
Sau 116.11	21/03/11	H. Clínicas	Conjuntivitis	Ex. conjuntival	F	81	pos/pos/pos
Sau 117.11	21/03/11	H. Clínicas	Absceso cutáneo glúteo	Ex. de absceso	M	39	pos/pos/pos
Sau 118.11	21/03/11	H. Clínicas	Absceso cutáneo MII	Ex. de piel	F	47	pos/pos/pos
Sau 119.11	21/03/11	H. Clínicas	Absceso cutáneo	Ex. de absceso	F	15	pos/pos/pos
Sau 120.11	21/03/11	H. Clínicas	Conjuntivitis	Secreción ocular	F	32	pos/pos/pos
Sau 122.11	21/03/11	H. Clínicas	Absceso cutáneo	Ex. de absceso	M	33	pos/pos/pos
Sau 126.11	29/03/11	H. Clínicas	Celulitis de mano	Ex. de herida	M	29	pos/pos/pos
Sau 128.11	27/01/12	H. Melo	Bacteriemia. Fallece	Hemocultivo	M	8	pos/pos/pos
Sau 129.11	27/01/12	H. Melo	Lesión de piel	Ex. de lesión	M	4	pos/pos/pos
Sau 132.12	09/03/12	H. Militar	Lesión de piel	Ex. de herida	M	20	pos/pos/pos

ANEXO I
CEPAS DE PACIENTES COMUNITARIOS

CEPA	RESIST. por DO	CLI por DO	ERI por DO	CIM CLI (µg/m L)	CIM ERI (µg/m L)	CIM OXA (µg/m L)
S 2.03	FOX, PEN	26 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	> 256 R
SHP 03.03	FOX, PEN	26 S	27 S	N/C	N/C	8 R
SHP 04.03	FOX, PEN	21 S	27 S	N/C	N/C	16 R
S 3.03	FOX, PEN	32 S	31 S	N/C	N/C	32 R
S 4.03	FOX, PEN	23 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	32 R
S 5.03	FOX, PEN	24 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	> 256 R
S 6.03	FOX, PEN	27 S	28 S	N/C	N/C	16 R
S 7.03	FOX, PEN	24 R IND. Fenot D+	6 R	0,064 S	> 256 R	32 R
SHP 05.03	FOX, PEN	25 S	25 S	N/C	N/C	16 R
SHP 06.03	FOX, PEN	24 S	26 S	N/C	N/C	16 R
SHP 08.03	FOX, PEN	24 R IND. Fenot D	6 R	0,064 S	> 256 R	16 R
SHP 11.03	FOX, PEN	24 R IND. Fenot D	6 R	0,064 S	> 256 R	16 R
SHP 13.03	FOX, PEN	22 S	26 S	N/C	N/C	8 R
SHP 14.03	FOX, PEN	22 S	25 S	N/C	N/C	16 R
SHP 19.03	FOX, PEN, CLO	25 S	28 S	N/C	N/C	8 R
SHP 20.03	FOX, PEN, CLO	24 S	25 S	N/C	N/C	16 R
S 9.03	FOX, PEN	30 S	28 S	N/C	N/C	64 R
S 10.03	FOX, PEN	28 S	28 S	N/C	N/C	64 R
S 13.04	FOX, PEN	23 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	> 256 R
S 14.04	FOX, PEN	23 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	128 R
S 19.04	FOX, PEN	25 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	32 R
Sau 02.04	FOX, PEN, CIP	6 R Fenot HD	6 R	>256 R	> 256 R	> 256 R
Sau 13.04	FOX, PEN	23 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	>256 R	> 256 R
Sau 23.05	FOX, PEN	25 S	26 S	N/C	N/C	32 R
Sau 34.06	FOX, PEN	21 R IND. Fenot D+	6 R	0,25 S	> 256 R	> 256 R
Sau 42.06	FOX, PEN, CIP, CLO	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	>256 R	256 R
Sau 43.06	FOX, PEN	26 S	28 S	N/C	N/C	64 R
Sau 60.07	FOX, PEN, CIP	25 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	>256 R	64 R
Sau 63.07	FOX, PEN, CLO	28 S	30 S	N/C	N/C	16 R
Sau 64.07	FOX, PEN	27 S	28 S	N/C	N/C	32 R
Sau 66.07	FOX, PEN	25 S	28 S	N/C	N/C	16 R
Sau 67.07	FOX, PEN	25 S	28 S	N/C	N/C	64 R
Sau 68.07	FOX, PEN	28 S	27 S	N/C	N/C	64 R
Sau 72.07	FOX, PEN	25 S	27 S	N/C	N/C	64 R
Sau 76.07	FOX, PEN	23 R IND. Fenot D+	6 R	0,064 S	> 256 R	32 R
Sau 84.07	FOX, PEN	24 R IND. Fenot D+	6 R	0,064 S	> 256 R	64 R
Sau 86.07	FOX, PEN	6 R Fenot R	6 R	>256 R	> 256 R	128 R
Sau 90.08	FOX, PEN	23 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	64 R
Sau 91.08	FOX, PEN	27 S	29 S	N/C	N/C	128 R
Sau 92.08	FOX, PEN, GEN	25 S	29 S	N/C	N/C	64 R
Sau 94.08	FOX, PEN	27 S	29 S	N/C	N/C	>256 R
Sau 99.08	FOX, PEN	6 R Fenot R	6 R	> 256 R	> 256 R	>256 R
Sau 103.09	FOX, PEN	31 S	30 S	N/C	N/C	64 R
Sau 108.11	FOX, PEN, CIP	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R
Sau 109.11	FOX, PEN, CIP, GEN, CLO	23 S	23 S	N/C	N/C	> 256 R
Sau 110.11	FOX, PEN	26 S	29 S	N/C	N/C	> 256 R
Sau 113.11	FOX, PEN, CIP	27 S	6 R	0,125 S	32 R	128 R
Sau 116.11	FOX, PEN, CIP	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R
Sau 117.11	FOX, PEN	24 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	128 R
Sau 118.11	FOX, PEN, GEN, CLO, CIP _{su}	24 R IND. Fenot D+	6 R	0,125 S	> 256 R	> 256 R
Sau 119.11	FOX, PEN	21 S	25 S	N/C	N/C	> 256 R
Sau 120.11	FOX, PEN, CIP	6 R Fenot HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R
Sau 122.11	FOX, PEN	24 S	24 S	N/C	N/C	> 256 R
Sau 126.11	FOX, PEN	28 S	29 S	N/C	N/C	64 R
Sau 128.11	FOX, PEN	22 S	28 S	N/C	N/C	8 R
Sau 129.11	FOX, PEN	23 S	24 S	N/C	N/C	16 R
Sau 132.12	FOX, PEN, RIF, CIP	6 R Fen HD	6 R	> 256 R	> 256 R	> 256 R

ANEXO I
CEPAS DE PACIENTES COMUNITARIOS

CEPA	CIM VAN (µg/m L)	MACROMÉTODO (VAN/TEI)	TAM. OXA	PVL	TSST-1	SCC _{mec}	PULSOTIPO
S 2.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
SHP 03.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
SHP 04.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
S 3.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
S 4.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
S 5.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
S 6.03	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	IV	C
S 7.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
SHP 05.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
SHP 06.03	2 S		positivo	positivo	negativo	S/T	A1
SHP 08.03	2 S		positivo	positivo	negativo	IV	A3
SHP 11.03	2 S		positivo	positivo	negativo	IV	A1
SHP 13.03	2 S		positivo	positivo	negativo	S/T	A5
SHP 14.03	2 S		positivo	positivo	negativo	IV	A4
SHP 19.03	2 S		positivo	positivo	negativo	IV	A
SHP 20.03	2 S		positivo	positivo	negativo	IV	A2
S 9.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
S 10.03	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
S 13.04	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
S 14.04	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
S 19.04	2 S	(8/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 02.04	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	B5
Sau 13.04	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 23.05	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 34.06	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 42.06	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	II	B
Sau 43.06	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 60.07	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 63.07	2 S	(4/8) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 64.07	2 S	(4/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 66.07	2 S	(4/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A8
Sau 67.07	2 S	(8/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 68.07	2 S	(8/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 72.07	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A6
Sau 76.07	2 S	(4/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A6
Sau 84.07	2 S	(8/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A9
Sau 86.07	2 S	(4/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 90.08	2 S	(8/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 91.08	2 S	(4/8) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A2
Sau 92.08	2 S	(4/8) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 94.08	2 S	(4/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A7
Sau 99.08	2 S	(4/8) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A1
Sau 103.09	2 S	(4/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A3
Sau 108.11	2 S	(4/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	B3
Sau 109.11	2 S	(4/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 110.11	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A1
Sau 113.11	2 S	(4/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	J
Sau 116.11	2 S	(4/4) VSSA	positivo	negativo	negativo	II	B3
Sau 117.11	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 118.11	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 119.11	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 120.11	1 S	N/C	positivo	negativo	negativo	IV	B
Sau 122.11	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A2
Sau 126.11	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 128.11	1 S	N/C	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 129.11	2 S	(4/4) VSSA	positivo	positivo	negativo	IV	A
Sau 132.12	2 S	(4/16) hVISA	positivo	negativo	negativo	II	B2

ABREVIATURAS DE TABLAS

Ex.: Exudado

Cat./Coa./ADN.: Catalasa/Coagulasa/ADNasa

Tam.: Tamizaje

DD: Disco Difusión

SD: Sensibilidad Disminuída

IPPD: Infección de Piel y Partes Blandas

MII: Miembro Inferior Izquierdo

MSD: Miembro Superior Derecho

S/T.: Sin Tipificar

N/C: No Corresponde

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN CON SISTEMA COMERCIAL FERMENTAS

Día 1: Descongelar las cepas en agar TSA. Incubar a 35°C.

Día 2: Repicar nuevamente en TSA. Incubar a 35°C.

Día 3:

- Preparar una suspensión densa de bacterias en un tubo de microcentrífuga conteniendo 200 µL de tampón TE.
- Adicionar 400 µL de solución de lisis y vortexear. Incubar a 65°C por 5 minutos.
- Adicionar inmediatamente 600 µL de cloroformo, emulsionar suavemente por inversión (3-5 veces) y centrifugar a 10.000 rpm durante 2 minutos.
- Preparar la solución de precipitación mezclando 720 µL de agua destilada estéril calidad molecular con 80 µL de la solución de precipitación 10X.
- Transferir la fase acuosa superior conteniendo el ADN a un nuevo tubo, agregar 800 µL de la solución de precipitación y mezclar suavemente por inversión durante 1-2 minutos. Centrifugar a 10.000 rpm durante 2 minutos.
- Remover el sobrenadante y disolver completamente el sedimento de ADN en 100 µL de solución de NaCl 1.2 M.
- Adicionar 300 µL de etanol frío, dejar precipitar el ADN a -20°C toda la noche y centrifugar a 10.000 rpm durante 3-4 minutos.
- Descartar el etanol y lavar el sedimento con alcohol frío 70%.
- Disolver el ADN en 100 µL de agua destilada estéril calidad molecular. Guardar los extractos a -20°C.

DETECCIÓN DEL GEN *mecA* MEDIANTE PCR**Cebadores:**

MECA P4: 5'- TCCAGATTACA ACTTCACCAGG - 3'

MECA P7 5'- CCACTTCATATCTTGTAACG - 3'

Gen *mecA*: 2322 bp (Acceso GenBank Y00688)**Ubicación de cebadores:** MECA P4: 1190-1211

MECA P7: 1351-1332

Producto de PCR: 162 pb**Mezcla de reacción (volumen final 50 μ L):**

	Concentración Final
2.5 μ L MgCl ₂ (50 mM)	2.5 mM
5 μ L 10 mM Tris-HCl (10X)	1 X
5 μ L dNTPs Mix (2.5 mM c/u)	0.25 mM
1 μ L MECA P4 (40 μ M)	
1 μ L MECA P7 (40 μ M)	
0.5 μ L Taq pol.	
34 μ L H ₂ O	
1 μ L ADN	

Programa de amplificación:

94°C 4 min

30 ciclos { 94°C 30 seg
53°C 30 seg
72°C 1 min

72°C 4 min

∞ 4°C

Electroforesis: gel 2%

DETERMINACIÓN DEL CASETE SCC_{mec} MEDIANTE PCR**Determinación del complejo *ccr*****Complejo Cebadores:**

<i>ccrAB1</i>	ccr-β2 5' - ATTGCCTTGATAATAGCCITCT - 3'
	ccr-α2 5' - AACCTATATCATCAATCAGTACGT - 3'
<i>ccrAB2</i>	ccr-β2 5' - ATTGCCTTGATAATAGCCITCT - 3'
	ccr-α3 5' - TAAAGGCATCAATGCACAAACACT - 3'
<i>ccrAB3</i>	ccr-β2 5' - ATTGCCTTGATAATAGCCITCT - 3'
	ccr-α4 5' - AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT - 3'

Ubicación de genes:

ccrAB1 (SCC_{mec} tipo I, acceso GenBank AB033763)

gen *ccrA1*: 23692- 25041

gen *ccrB1*: 25063-26214

ccrAB2 (SCC_{mec} tipo II, acceso GenBank D86934)

gen *ccrA2*: 25411- 26760

gen *ccrB2*: 26782- 28410

ccrAB3 (SCC_{mec} tipo III , acceso GenBank AB037671)

gen *ccrA3*: 5430- 6776

gen *ccrB3*: 6797- 8425

Ubicación de cebadores:

Cebador *ccr-α2* específico del gen *ccrA1*

Cebador *ccr-α3* específico del gen *ccrA2*

Cebador *ccr-α4* específico del gen *ccrA3*

Cebador *ccr-β2* común a *ccrB1*, *ccrB2* y *ccrB3*

Productos de PCR:*ccrAB1*: 695 pb*ccrAB2*: 937 pb*ccrAB3*: 1791 pb**Mezcla de reacción (volumen final 50 μ L):**

	Concentración Final
2.5 μ L MgCl ₂ (50 mM)	2.5 mM
5 μ L 10 mM Tris-HCl (10X)	1 X
5 μ L dNTPs Mix (2.5 mM c/u)	0.25 mM
8 μ L <i>ccr</i> - β 2 (5 μ M)	
8 μ L <i>ccr</i> - α 2 (5 μ M)	
8 μ L <i>ccr</i> - α 3 (5 μ M)	
8 μ L <i>ccr</i> - α 4 (5 μ M)	
0.5 μ L Taq pol.	
4 μ L H ₂ O	
1 μ L ADN	

Programa de amplificación:

94 °C 5 min

30 ciclos {
94 °C 30 s
63 °C 1 min
72 °C 1 min

72 °C 5 min

 ∞ 4 °C**Electroforesis:** gel 1.5%

Detección del complejo *mec* clase A**Cebadores:**

mI-1 5'- AATGGCGAA AAAGCACAACA - 3'

mI-2 5'- GACTTGATTGTTTCCTCTGTT - 3'

Genes *mecR1* y *mecI* en complejo *mec* clase A: 2471 bp (Acceso GenBank X63598)Ubicación de gen *mecI*: 1982-2353**Ubicación de cebadores:** mI-1: 1923-1942

mI-2: 2403-2283

Producto de PCR: 480 pb**Mezcla de reacción (volumen final 50 μ L)**

	Concentración Final
2.5 μ L MgCl ₂ (50 mM)	2.5 mM
5 μ L 10 mM Tris-HCl (10X)	1 X
5 μ L dNTPs Mix (2.5 mM c/u)	0.25 mM
2 μ L mI-1 (10 μ M)	
2 μ L mI-2 (10 μ M)	
0.5 μ L Taq pol.	
32 μ L H ₂ O	
1 μ L ADN	

Programa de amplificación:

94 °C 5 min

30 ciclos { 94 °C 30 s
50 °C 1 min
72 °C 2 min

72 °C 10 min

∞ 4 °C

Electroforesis: gel 1.5%

Detección del complejo *mec* clase B**Cebadores:**

Is1272 5'-ATTTTGGGTTTCACTCGGAT-3'

mecR1 5'-CAAATATTAAGAACGTGTT-3'

Ubicación de elementos génicos (SCC*mec* tipo I, acceso GenBank AB033763):

IS1272: 28473- 30057

 Δ *mecR1*: 30304- 31290**Ubicación de cebadores:** IS1272: 29852- 29870

mecR1: 30416- 30397

Producto de PCR: 565 pb**Mezcla de reacción (volumen final 50 μ L)**

	Concentración Final
2.5 μ L MgCl ₂ (50 mM)	2.5 mM
5 μ L 10 mM Tris-HCl (10X)	1 X
5 μ L dNTPs Mix (2.5 mM c/u)	0.25 mM
8 μ L Is1272 (5 μ M)	
8 μ L mecR1 (5 μ M)	
0.5 μ L Taq pol.	
20 μ L H ₂ O	
1 μ L ADN	

Programa de amplificación:

95 °C 5 min

30 ciclos	{	95°C 1 min
		55°C 1 min
		72°C 1 min

72 °C 10 min

∞ 4 °C

Electroforesis: gel 1.5%

Detección de SCCmec Tipo V

Cebadores para ORF V011:

Tipo V-F 5'- GAACATTGTTACTTAAATGAGCG - 3'

Tipo V-R 5'- TGAAAGTTGTACCCTTGACACC - 3'

Ubicación de ORF V011: 10611-12599 en SCCmec tipo V (Acceso GenBank AB121219)

Específico de SCCmec tipo V

Ubicación de cebadores: Tipo V-F: 10917- 10939

Tipo V-R: 11241- 11220

Producto de PCR: 325 pb

Mezcla de reacción (volumen final 25 µL)

	Concentración Final
2.5 µL 10 mM Tris-HCl (10X)	1X
1.25 µL MgCl ₂ (50 mM)	2.5 mM
2,5 µL dNTPs Mix (2.5 mM c/u)	0.25 mM
2 µL Tipo V-F (10 µM)	
2 µL Tipo V-R (10 µM)	
0.25 µL Taq pol.	
14 µL H ₂ O	
0.5 µL ADN	

Programa de amplificación:

94°C 5 min

10 ciclos { 94°C 45 s
65°C 45 s
72°C 1.5 min25 ciclos { 94°C 45 s
55°C 45 s
72°C 1.5 min

72°C 10 min

∞ 4°C

Electroforesis: gel 1.5%**DETECCIÓN DE LOS GENES PARA LA PVL MEDIANTE PCR****Cebadores:**

luk-PV-1: 5'- ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA - 3'

luk-PV-2: 5'- GCATCAACTGTATTGGATAGCAAAAAGC - 3'

Genes *lukS-PV* y *lukF-PV*: 3826 bp (Acceso GenBank X72700)Ubicación del gen *lukS-PV*: 1055-1993Ubicación del gen *lukF-PV*: 1995-2972**Ubicación de cebadores:** luk-PV-1: 1640-1670

luk-PV-2: 2072-2046

Producto de PCR: 433 pb

Mezcla de reacción (volumen final 50 μ L)

	Concentración Final
2.5 μ L MgCl ₂ (50 mM)	2.5 mM
5 μ L 10 mM Tris-HCl (10X)	1 X
5 μ L dNTPs Mix (2.5 mM c/u)	0.25 mM
6 μ L luk-PV-1 (5 μ M)	
6 μ L luk-PV-2 (5 μ M)	
0.5 μ L Taq pol.	
24 μ L H ₂ O	
1 μ L ADN	

Programa de amplificación:

94°C 5 min

30 ciclos {

- 94°C 30 s
- 60°C 30 s
- 72°C 1 min

72°C 10 min

∞ 4°C

Electroforesis: gel 1.5%**DETECCIÓN DEL GEN PARA LA TSST-1 MEDIANTE PCR****Cebadores:**

TSST1: 5'- ATGGCAGCATCAGCTTGATA - 3'

TSST2: 5'- TTTCCAATAACCCCGTTT - 3'

Gen tst: 731 bp (Acceso GenBank J02615)**Ubicación de cebadores:** TSST1: 251-270

TSST2: 600-581

Producto de PCR: 350 pb

Mezcla de reacción (volumen final 25 μ L)

	Concentración Final
2.5 μ L 10 mM Tris-HCl (10X)	1X
1.25 μ L MgCl ₂ (50 mM)	2.5 mM
2,5 μ L dNTPs Mix (2.5 mM c/u)	0.25 mM
3 μ L TSST1 (5 μ M)	
3 μ L TSST2 (5 μ M)	
0.25 μ L Taq pol	
12 μ L H ₂ O	
0.5 μ L ADN	

Programa de amplificación:

94°C 5 min

30 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 2 \text{ min} \\ 51^{\circ}\text{C} \quad 2 \text{ min} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 1 \text{ min} \end{array} \right.$

72°C 10 min

 ∞ 4°C**Electroforesis:** gel 1.5%**ELECTROFORESIS PARA DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR****Gel 1.5%** (cuba 50 mL)

47.5 mL agua destilada

2.5 mL tampón TBE 10X

0.75 g agarosa

Gel 2% (cuba 50 mL)

47.5 mL agua destilada

2.5 mL tampón TBE 10X

1 g agarosa

Calentar en microondas hasta fundir la agarosa.

Pasar a un matraz específico para bromuro y agregar 1.55 μ L de bromuro de etidio.

Verter la agarosa en el molde y dejar solidificar (aproximadamente 30 minutos).

Tampón de corrida TBE 0.5 X

950 mL agua destilada

50 mL de tampón TBE 10X

Cargar en el gel

10 μ L producto de PCR + 2 μ L de tampón de carga

1 μ L marcador de peso molecular + 2 μ L de tampón de carga

Condiciones de corrida

45 minutos a 100 V para el gel 1.5%

1 hora a 100 V para el gel 2%

ELECTROFORESIS EN CAMPOS PULSADOS

Preparación de bloques de agarosa

Día 1.- Descongelar las cepas en agar TSA.

Día 2.- Inocular 1 colonia en 5 mL de caldo TSB e incubar en baño de agua a 37°C durante toda la noche. Agregar un tubo de TSB para control de esterilidad.

Día 3.-

- Sembrar media placa de cada tubo para control de pureza.
- Colocar 500 μ L del caldo con crecimiento en un tubo de microcentrífuga.
- Centrifugar por 2 minutos a 10.000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento con 500 μ L de TE.
- Centrifugar por 2 minutos a 10.000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y resuspender en 200 μ L TE. Vortexear.
- Mientras tanto preparar agarosa de PFGE al 1.5%: 0.15g de agarosa en 10 mL de TE. Mantenerla en baño a 42°C por lo menos 10 minutos antes de usarla.

-
- Colocar 5 μ L de la suspensión en una cubeta de espectrofotómetro con 1 mL TE. Cubrirla con parafilm y mezclar por inversión. Preparar un blanco con TE solo. Medir absorbancia a 620 nm, el rango aceptable es 0.05-0.15.
 - Calcular el volumen de TE a agregar: $(OD \times 40 \times 210) - 210$. Agregar el volumen de TE específico para cada muestra. Vortexear.
 - Pasar a tubos nuevos, 150 μ L de la suspensión y colocarlos en el baño a 42°C (aproximadamente 10 min). Agregar a cada uno, 150 μ L de agarosa y mezclar suavemente con la pipeta para no hacer burbujas. Colocar en el molde para bloques (2 bloques por muestra).
 - Dejar solidificar a 4°C durante 10 minutos.
 - Mantener 10 minutos a temperatura ambiente.
 - Preparar previamente la solución de lisis: 75 μ L ARNasa + 75 μ L Lysozima + 75 μ L Lysostafina + 14.775 mL de EC.
 - Trasladar los bloques con un ansa descartable, a tubos de 15 mL conteniendo 1mL de solución de EC-lisis, descartar los que estén rotos o con burbujas. Cuidar que no queden adheridos a las paredes. Incubar 5 horas en baño de agua a 37°C.
 - Descartar la solución de EC-lisis por volcado usando tapas coladoras comerciales para atrapar los bloques.
 - Preparar 15 mL de solución ESP (0.75 mL proteinasa K + 14.25 mL ES). Agregar 1 mL de ESP a cada tubo. Incubar en baño a 50°C durante toda la noche.

Día 4.-

- Descartar ESP por volcado.
- Agregar 13 ml TE, lavar 30 minutos en agitador plano en posición casi horizontal y descartar el TE.
- Repetir el lavado 5 veces, 30 minutos cada vez.
- Guardar a 4 °C en 5 mL de TE hasta su uso (3-4 meses).

Restricción de los bloques

1) Equilibración

- Preparar por adelantado tampón SmaI (15 mL de tampón pre-SmaI + 6.3 μ L mercaptoetanol).

- Cortar un bloque en 3 partes, en el sentido del eje mayor.
- Transferir 1/3 de bloque a un tubo de microcentrífuga conteniendo 500 µl de tampón SmaI.
- Incubar a 25°C durante 1 hora.
- Remover el tampón con pipeta de 1 mL.

2) Restricción

- Agregar 50 µL de mezcla de restricción (970 µL de tampón SmaI + 30 µL de enzima SmaI).
- Incubar a 25° durante toda la noche.

Día 5.-

3) Detener la reacción

- Agregar 5µL de tampón de carga y equilibrar por 10 minutos.
- Si no es necesario para uso inmediato, agregar 10 µL de ES y guardar a 4°C.

Preparación del gel

Limpiar todas las partes del molde para el gel con agua destilada, armarlo y asegurarse de que esté perfectamente horizontal usando un nivel.

1) Preparación de la agarosa

- Preparar 180 mL de agarosa para PFGE al 1%. Pesar 1.8 gramos de agarosa, agregar 9 mL de TBE 10X más 171 mL de agua destilada.
- Calentar en el microondas hasta lograr fundir la agarosa y luego mantenerla en baño a 42°C.

2) Preparación del tampón de corrida

Preparar TBE 0.5X con 100 mL de TBE 10X y agua destilada hasta un volumen final de 2 litros.

3) Montaje del gel

- Poner el peine en posición horizontal. Con la ayuda de un anso, colocar los bloques en los dientes del peine y secarlos cuidadosamente con papel absorbente. Colocar el peine en la posición correcta en el molde.
- Verter la agarosa suavemente y asegurarse de que no se formen burbujas. Reservar 5 mL para el sellado de los pocillos.
- Dejar que el gel solidifique (aproximadamente 30 min.). Retirar el peine y sellar los pocillos.

4) Preparación de la máquina

- Lavar la máquina por lo menos dos veces con 2 lt de agua destilada cada vez.
- Poner el marco negro y asegurarse de que la cuba este perfectamente horizontal utilizando un nivel.
- Adicionar 2 lt de tampón de corrida (TBE 0.5 X).
- Encender la máquina. Programar a 70 la bomba de velocidad variable y encenderla.
- Programar la temperatura del sistema de enfriamiento a 11.3°C.
- Tiempo inicial: 5 segundos.
- Tiempo final: 35 segundos.
- Tiempo de corrida: 23 horas.
- Voltaje: 200 volts o 6 volts/cm.
- Revisar los parámetros, colocar el gel y presionar inicio.
- Transcurrido el tiempo de corrida, sacar el gel y lavar la máquina dos veces con 2 litros de agua destilada cada vez.

5) Teñido del gel

- Teñir el gel con bromuro de etidio (50 μ L de solución 10 mg/mL en 500 mL de H₂O, concentración final 1 μ g/mL) por 30 minutos sobre un agitador horizontal a temperatura ambiente. Siempre cubrir el gel para evitar la desnaturalización de la tinta.
- Desteñir el gel con 500 mL de agua destilada, por 30 minutos en agitador.
- Cambiar el agua y desteñir por 30 minutos más.
- Tomar una fotografía y guardarla en formato TIFF.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1 M Tris pH 8

Pesar 12.1 g de Tris y agregar 80 mL de H₂O_{dest.}. Ajustar a pH 8 agregando aproximadamente 4.2 mL de HCl concentrado. Completar el volumen a 100 mL. Autoclavar.

0.5 M EDTA pH 8

Pesar 37.2 g de EDTA y agregar 160 mL de H₂O_{dest.}. Agitar y ajustar a pH 8 agregando aproximadamente 4.5 g de NaOH. Completar el volumen a 200 mL. Autoclavar.

1 M Tris pH 7.5

Pesar 12.1 g de Tris y agregar 80 mL de H₂O_{dest.}. Ajustar a pH 7.5 agregando aproximadamente 5.5 mL de HCl concentrado. Completar el volumen a 100 mL. Autoclavar.

Tampón TE

	Para 1000 mL	Concentración Final
1 M Tris pH 7.5	10 mL	10 mM
0.5 M EDTA pH 8	2 mL	1 mM
H ₂ O _{dest}	988 mL	
Autoclavar		

Tampón EC

	Para 500 mL	Concentración Final
1 M Tris pH 8	3 mL	6 mM
NaCl	29.2 g	1M
0.5 M EDTA pH 8	100 mL	100 mM
Deoxicolato de sodio	1 gm	0.2%
Laurylsarcocina de sodio	2.5 gm	0.5%
H ₂ O _{dest} hasta completar	500 mL	
Autoclavar		

ARNasa A

Disolver 30 mg de ARNasa (Sigma^R) en 3 mL de H₂O_{dest} calidad molecular y mantener a 100°C durante 15 minutos. Alicuotar y almacenar a -20°C.

Solución de lisis EC

	Para 15 mL	Concentración Final
ARNasa A (10 mg/mL)	75 µL	50 µg/mL
Lysozima (20 mg/mL)	75 µL	100 µg/mL
Lysostafina (10 mg/mL)	75 µL	50 µg/mL
Tampón EC	14.775 mL	

Tampón ES

Pesar 93.1 g EDTA y disolver en 400 mL de H₂O_{dest}. Ajustar a pH 9 agregando aproximadamente 15 g de NaOH. Agregar 5 g laurylsarcocina de sodio. Completar el volumen a 500 mL con H₂O_{dest}. Autoclavar.

Tampón ESP

	Para 15 mL	Concentración Final
Proteinasa K (20 mg/mL)	0.75 mL	1mg/mL
ES	14.25 mL	

Tampón pre-Sma I

	Para 500 mL	Concentración Final
1 M Tris pH 8	3 mL	6 mM
KCl	0.7456 g	20 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.60993 g	6 mM
H ₂ O _{dest}	497 mL	
Autoclavar		

Tampón Sma I

15 mL de tampón pre-SmaI

6.3 µL de mercaptoetanol

Tampón de restricción

	Para 1000 μ L	Concentración Final
Sma I (Roche ^R) (10000 U/mL)	30 μ L	300 U/mL
Tampón Sma I	970 μ L	

Tampón TBE 10X

	Para 1 L
Tris	108 g
Acido Bórico	55 g
0.5 M EDTA pH 8	40 mL
H ₂ O _{dest} hasta completar	1L
Autoclavar	

