



**ESTANDARIZACIÓN DE UNA HERRAMIENTA MOLECULAR PARA LA  
IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE DOS CLONES DE *Staphylococcus  
aureus* RESISTENTES A METICILINA DE GENOTIPO COMUNITARIO (SARM-  
GC) DE CIRCULACIÓN EN COLOMBIA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C.**

**2018**



***ESTANDARIZACIÓN DE UNA HERRAMIENTA MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE DOS CLONES DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA DE GENOTIPO COMUNITARIO (SARM-GC) DE CIRCULACIÓN EN COLOMBIA.***

**JAMES ALEXANDER ANCHICO GODOY**

**MARIO ALBERTO LAURENS HERNÁNDEZ**

*Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar por el título de:*  
**Bacteriólogo y laboratorista clínico**

**Asesor Externo:**

**PhD (c) MSc Betsy Esperanza Castro Cardozo**  
Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana- Universidad El Bosque

**Asesor Interno:**

**MSc Liliana Constanza Muñoz**  
Docente investigadora- Laboratorio de Biotecnología, UCMC

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C.**

**2018**

## DEDICATORIA

A Dios, mi guía y protector incondicional en cada paso que doy, sin el nada de esto hubiese sido posible.

A mis padres luchadores incansables y a mi Hermana, mi tesoro máspreciado. Gracias por la comprensión y el apoyo en todo mi crecimiento profesional y académico. Son la mejor familia del mundo.

A Neisy, mi amiga y hermana de toda la vida, el ejemplo de superación a seguir más grande que tengo. Verte crecer y seguir a delante, pese a cualquier dificultad, me dio la valentía de caminar.

A Mario, mi amigo y hermano. Ejemplo de paciencia, gracias por caminar junto a mí en este proceso, por darme fuerza y aliento cuando las cosas se tornaban difíciles y por ser ese amigo incondicional. Infinitas gracias.

A mi Tumaco del Alma, una de las principales razones por las que salí a enfrentarme a lo desconocido fue aportar a tu futuro. Aún sigo trabajando en ello.

A todas las personas que hicieron parte de este proceso.

**James A. Anchico G.**

A Dios por darme la vida y ayudarme a demostrarme a mí mismo que soy capaz de lograr cualquier objetivo que me proponga, sin su presencia en mi vida nada sería posible.

A mis Padres, la luz que guía mi camino al andar, por sus sacrificios y su ejemplo de humildad, perseverancia y el amor más puro aquí en la tierra.

A mis hermanos, Caro, Jeff, Kev y Moiso, los mejores amigos que la vida me dio, el apoyo y la compañía más preciosa.

A Yslen, mi compañera de aventuras, mejor amiga, y ejemplo a seguir por su paciencia y ganas de salir siempre adelante y jamás rendirse hasta cumplir todos sus sueños.

A toda mi Familia, Abuelitos, Tíos, Padrinos, Primos, mi sobrino Juanito, por estar siempre en cada momento de mi vida y ser la fuente de energía inagotable de alegría, y ánimo para nunca darme por vencido.

A James, por compartir este proceso conmigo, por su sinceridad, incondicionalidad y humildad. Infinitas Gracias. Lo logramos.

A todos mis amigos y personas que hicieron parte de este proceso, fieles compañeros de lucha.

**Mario A. Laurens H.**

## AGRADECIMIENTOS

Para la realización del presente trabajo de grado hemos recibido la ayuda indispensable de diferentes personas o instituciones. Por este motivo, deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento:

- Al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana “LGMB”, de la Universidad El Bosque, y al proyecto de COLCIENCIAS contrato 607-2014 por su financiamiento y préstamo de sus instalaciones para la realización de todos los ensayos.
- A la Docente investigadora PhD (c) MSc Betsy Esperanza Castro Cardozo, por su ayuda imprescindible y asesoramiento constante en la fase experimental y elaboración del documento.
- Al equipo de trabajo del LGBM, por sus aportes y colaboración en nuestro proceso. (Javier Escobar, Zayda Corredor, Alejandro Márquez, Deisy Abril).
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, nuestra alma mater, por todos los conocimientos compartidos para poder culminar con éxito este proyecto.
- A nuestras familias por sus consejos y continuo interés durante todo nuestro proceso académico.
- A nuestros amigos del programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por sus consejos y apoyo en el desarrollo profesional y personal. (Yulieth, Paola, Gabriela, Vanessa, Lucia, Mafe, Angelita, Alexandra, Carolina).

<b>RESUMEN EJECUTIVO .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>13</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>16</b>
<b>3. MARCO TEORICO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Generalidades de <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Factores de patogenicidad y virulencia .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3. Mecanismo de acción de los B- lactamicos .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4. Mecanismo de resistencia a la meticilina.....</b>	<b>27</b>
<b>3.5. Clasificación de los aislamientos <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina (SARM).....</b>	<b>28</b>
<b>3.6. Características moleculares de SARM. Tipo y subtipo de Casete Estafilocócico Cromosomal SCC<i>mec</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>3.7. Elementos genéticos móviles presentes en <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>3.7.1. Elemento móvil del catabolismo de la arginina (ACME).33</b>	
<b>3.7.2. Islas de patogenicidad .....</b>	<b>34</b>
<b>3.7.3. Islas genómicas vSα y vSαβ .....</b>	<b>37</b>
<b>3.8. Características moleculares asociadas al clon COL 923 y al clon USA300 VL.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9. Epidemiología de SARM en Colombia .....</b>	<b>44</b>
<b>4. PREGUNTA PROBLEMA .....</b>	<b>46</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1. Objetivo General.....</b>	<b>47</b>

5.2. Objetivos específicos.....	47
<b>6. METODOLOGIA .....</b>	<b>48</b>
6.1. Tipo de estudio .....	48
6.2. Técnicas y procedimientos .....	50
6.2.1. Extracción y cuantificación de ADN .....	50
6.2.2. Descripción de los aislamientos .....	51
6.2.3. Amplificación de los elementos genéticos móviles de los aislamientos clínicos por PCR individual .....	52
6.2.4. Diseño de PCR múltiple.....	55
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
7.1. Caracterización de los aislamientos .....	59
7.1.1. Fuente de los aislamientos pertenecientes al estudio .....	59
7.1.2. Clasificación por resistencia a metilina.....	60
7.2. Estandarización de PCR múltiple para la identificación de SARM-GC de circulación en Colombia .....	61
7.3. Condiciones para la digestión del gen Acetil coenzima A Acetil Transferasa ( <i>yqil</i> ).....	65
7.4. Evaluación de la frecuencia de los EGM en todos los aislamientos .....	67
7.5. Digestión del gen <i>yqil</i> .....	74
<b>8. DISCUSION .....</b>	<b>76</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Reemplazos clonales en Colombia. ....	21
<b>Figura 2.</b>	Mecanismo de acción de los B-lactámicos. ....	26
<b>Figura 3.</b>	Diferencias en el SCC <i>mec</i> de los aislamientos SARM-GC y SARM-GH. ...	30
<b>Figura 4.</b>	Estructura del casete estafilococcico cromosomal <i>mec</i> .....	31
<b>Figura 5.</b>	Elemento genético de SaPI 1. ....	35
<b>Figura 6.</b>	Elemento genético de SaPI 3. ....	36
<b>Figura 7.</b>	Comparación de los aislamientos relacionados genéticamente con COL 923 y USA300 VL. ....	40
<b>Figura 8.</b>	Árbol filogenético que relaciona los aislamientos con su respectivo clon. ...	41
<b>Figura 9.</b>	Estructura de la isla $\beta$ presentes en el clon COL 923 y USA300 VL. ....	42
<b>Figura 10.</b>	Estructura del profago 3 presentes en el clon COL 923 y USA300 VL. ....	43
<b>Figura 11.</b>	Estructura de la región J3 del SCC <i>mec</i> presentes en el clon COL 923 y USA300 VL. ....	43
<b>Figura 12.</b>	Perfil electroforético de los amplímeros de los aislamientos SARM-GC obtenidos por medio de PCR múltiple. ....	56
<b>Figura 13.</b>	Resumen metodológico .....	58
<b>Figura 14.</b>	Fuentes de infección. ....	60
<b>Figura 15.</b>	Clasificación de los aislamientos por su tipo de SCC <i>mec</i> .....	61
<b>Figura 16.</b>	Determinación de la concentración adecuada de cada uno de los iniciadores de la PCR múltiple. ....	62

<b>Figura 17.</b>	Determinación de la temperatura de anillamiento de los iniciadores usados en la PCR múltiple.....	63
<b>Figura 18.</b>	Elementos genéticos móviles de los clones COL 923 y USA300 VL a concentraciones de iniciadores previamente establecidas de manera individual.....	64
<b>Figura 19.</b>	Ciclo definido de la PCR múltiple.....	65
<b>Figura 20.</b>	Estandarización de la digestión del gen <i>yqil</i> con enzima NdeI .....	66
<b>Figura 21.</b>	PCR múltiple para la identificación del clon COL 923 y USA300 VL.....	67
<b>Figura 22.</b>	Elementos genéticos móviles.....	69
<b>Figura 23.</b>	Comparación de la presencia de SaPI 5 en las dos técnicas de PCR.....	70
<b>Figura 24.</b>	Comparación de la presencia de $\phi$ sa 3 en las dos técnicas de PCR.....	71
<b>Figura 25.</b>	Comparación de la presencia de $\beta$ -island en las dos técnicas de PCR .....	72
<b>Figura 26.</b>	Aislamientos identificados mediante PCR múltiple .....	73
<b>Figura 27.</b>	Digestión del gen <i>yqil</i> en los aislamientos estudiados.....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ..... 24
<b>Tabla 2.</b>	Características epidemiológicas inicialmente empleadas para la clasificación de los SARM de genotipo comunitario y genotipo hospitalario... 29
<b>Tabla 3.</b>	Actualización y diferenciación de los tipos de SCCmec ..... 30
<b>Tabla 4.</b>	Principales características moleculares halladas en los controles usados para la estandarización de la PCR múltiple... 51
<b>Tabla 5.</b>	Lista de iniciadores utilizados para la amplificación de genes marcadores de los EGM en aislamientos de SARM-GC, diseñados y estandarizados previamente por el LGMB ..... 52
<b>Tabla 6.</b>	Protocolos establecidos para la amplificación de los EGM por PCR individual... 54
<b>Tabla 7.</b>	Iniciadores empleados en el diseño de la PCR múltiple con el gen que amplifica, su respectivo tamaño dado en pb y el clon asociado... 55
<b>Tabla 8.</b>	Concentraciones de reacción, concentraciones iniciales y volúmenes a tomar de cada uno de los reactivos... 64
<b>Tabla 9.</b>	Datos obtenidos de las técnicas convencionales de tipificación, PCR múltiple e índice Kappa de Cohen para las tres poblaciones evaluadas... 74

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>ACME</b>	Elemento móvil del catabolismo de la arginina
<b>BGN</b>	Bacilos gram negativos
<b>CCR</b>	Casete recombinasa cromosomal
<b>EGM</b>	Elemento genético móvil
<b>GREBO</b>	Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá
<b>LGMB</b>	Laboratorio de genética molecular bacteriana
<b>MLST</b>	Tipificación multilocus de secuencias
<b>PBP</b>	Proteína de unión a la penicilina
<b>PCR</b>	Reacción en cadena a la Polimerasa
<b>PFGE</b>	Electroforesis en gel de campo pulsado
<b>PTSAs</b>	Superantígenos de toxinas pirogénicas
<b>PVL</b>	Leucocidina de Pantón Valentine
<b>SaPI</b>	Isla de patogenicidad de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<b>SARM-GC</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina genotipo comunitario
<b>SARM-GH</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina genotipo hospitalario
<b>SCCmec</b>	Casete Estafilocócico Cromosomal <i>mec</i>
<b>SE</b>	Enterotoxina estafilococcica
<b>ST</b>	Tipo de secuencia
<b>STR</b>	Secreciones de tracto respiratorio
<b>TM</b>	Temperatura Melting
<b>TSST</b>	Toxina del Shock tóxico
<b>USA300-VL</b>	USA300-Variante latinoamericana

## RESUMEN EJECUTIVO

*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de genotipo comunitario (SARM-GC) son un grupo de aislamientos de gran importancia clínica y epidemiológica debido a su emergencia en el ambiente comunitario y rápida diseminación en ambientes hospitalarios, gracias a su gran capacidad de adquirir mecanismos de virulencia y resistencia a antibióticos por medio de material genético foráneo. En Colombia, desde las últimas décadas, se ha identificado el incremento de infecciones generadas por SARM-GC; asociados únicamente a los clones USA300- variante Latinoamericana (USA300-VL) y COL923. Estos clones difieren entre sí en sus características genéticas y moleculares, debido a la presencia de diferentes subtipos de SCC*mec*, variaciones en la estructura de islas genómicas, perfil de resistencia y virulencia. Lo cual hace necesario realizar una adecuada identificación y caracterización de estos clones, lo que permitirá entender mejor su patogénesis, frecuencia y dinámicas de diseminación. Por esta razón el presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar una PCR múltiple como herramienta para la identificación y diferenciación de aislamientos pertenecientes a los clones USA 300VL y COL923 de circulación nacional, en la cual se amplifican genes marcadores presentes en los elementos genéticos móviles de cada clon. Una vez estandarizado esta metodología se verificó su poder discriminatorio en una cohorte de 106 aislamientos provenientes de diferentes fuentes clínicas, previamente clasificadas como SARM-GC.

Los resultados mostraron que si existen características moleculares que difieren a los clones USA 300VL y COL923 en la Isla de patogenicidad 5 de *Staphylococcus aureus* (SaPI5), Prografo 3 ( $\phi$ 3), Isla genómica beta y *yqiL* que permitieron su identificación y diferenciación por medio de PCR. Se logró identificar que el 68% de aislamientos, de los

evaluados en el estudio, se encuentran genéticamente relacionados con el clon USA 300VL; y que el 32% restante se asocian al clon COL923.

Con los resultados obtenidos se pudo concluir que esta herramienta es rápida, menos costosa y dispendiosa a comparación de otras herramientas de identificación molecular tales como PFGE y MLST y que a su vez, brinda la posibilidad a que haya un mayor control epidemiológico de estos aislamientos teniendo en cuenta que tan variante es la epidemiología de este microorganismo.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, genotipo comunitario, resistencia a meticilina, reacción en cadena de la polimerasa, genotipo comunitario, USA300-VL, COL923.

## 1. INTRODUCCIÓN

Se define como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) a los aislamientos de *S. aureus*, que han adquirido el Casete Estafilocócico Cromosomal *mec* (SCC*mec* por sus siglas en inglés), que posee el gen *mecA*, el cual codifica para una proteína de unión a la penicilina modificada (PBP2a) confiriendo resistencia a la mayoría de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (1). Este patógeno se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, por tratarse de una bacteria oportunista responsable de un gran espectro de infecciones desde leves a graves; como infecciones de piel y tejidos blandos hasta bacteriemias y septicemias (1, 4).

El perfil de resistencia que presentan los aislamientos SARM, limita considerablemente el tratamiento a las infecciones puesto que los antibióticos B-lactámicos son la principal opción en la terapia antimicrobiana por su bajo costo y amplio espectro (2). Tradicionalmente, SARM ha tenido un alto impacto a nivel hospitalario, afectando a pacientes pediátricos y adultos que presentan factores de riesgo como: patologías de base, uso de dispositivos médicos invasivos (catéteres, sondas y líneas arteriales, entre otros) consumo de antibióticos de amplio espectro y hospitalizaciones prolongadas (3). A estos aislamientos que circulan únicamente en este ambiente hospitalario se les denominan *Staphylococcus aureus* de genotipo hospitalario (SARM-GH), los cuales se caracterizan principalmente por su perfil de multirresistencia a diferentes familias de antibióticos pero con virulencia limitada (4).

La epidemiología de SARM presentan un comportamiento epidemiológico en forma de “Olas” o “Cambios clónales” lo cual consiste en que durante un tiempo indefinido un clon específico de SARM predomina en una zona geográfica, (país o continente) pero después de un tiempo este clon es remplazado por otro, generando que la frecuencia del primero disminuya o incluso desaparezca, quedando el nuevo clon predomine en la zona específica. Aunque no es claro en mecanismo por el cual se da este proceso se cree que la adquisición de material genéticos foráneo proporciona ventajas adaptativas es estos clones (4,5)

En Colombia, el estudio de los aislamientos de SARM, han permitido describir dos olas epidemiológicas importantes presentadas entre los años 1994 hasta la fecha. La primera estuvo asociada a aislamientos de genotipo hospitalario, en el cual el clon chileno remplazo al clon pediátrico a mediados del año 2003 (5). Hasta ese momento ningún aislamiento de genotipo comunitario había sido reportado en nuestro país (5). Luego de este primer recambio a mediados del año 2005, se dio lo que hoy se considera como el segundo reemplazo clonal de SARM en nuestro país, generado esta vez por los aislamientos de genotipo comunitario, con la diseminación de un clon relacionado genéticamente con el clon pandémico USA 300 (*SCCmec* VIa, ACME+) de circulación en Estados Unidos, Europa y Asia, pero con baja frecuencia en Colombia. Genéticamente presenta un *SCCmec* VIc y ausencia de ACME, este clon es denominado variante latinoamericana (USA300-VL), y está asociado también a infecciones adquiridas en casi un 90%. (6), pero en la actualidad no solo afecta a personas en la comunidad si no en el ambiente hospitalario; lo cual lo convierte en un clon predominante sobre los aislamientos de genotipo hospitalario (7). Adicionalmente, desde el año 2010, se identificó que el clon USA300-VL no es el

único causante de infecciones en Colombia, puesto que se determinó la co-circulación de un nuevo clon en cuatro regiones de Colombia (8), el cual no está estrechamente relacionado genéticamente con el USA300-VL, posee un subtipo de *SCC<sub>mec</sub> VIa* y difieren en varios elementos genéticos móviles (EGM) denominó COL923 (8).

## 2. ANTECEDENTES

El primer caso de infección producida por un aislamiento de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) fue reportado y publicado en España en 1981 (44). Desde entonces se ha generalizado la comunicación de casos y brotes de infección por SARM en muchos hospitales españoles (44). Hasta entonces, la mayoría de las infecciones por SARM estaban limitadas al medio hospitalario.

En el año 1993 se detectaron en Australia (3) cepas de SARM causantes de infecciones en aborígenes que habitaban en comunidades lejanas y que no habían sido previamente hospitalizados (3). Estas cepas fueron caracterizadas molecularmente y se pudo demostrar la emergencia de un nuevo tipo de cepas de SARM, completamente distintas a las aisladas en los hospitales hasta esa fecha. Posteriormente, en 1999, la notificación en Estados Unidos de cuatro casos en niños que fallecieron con infecciones graves por SARM asociados a la comunidad (SARM-GC), alertó sobre la emergencia y gravedad del SARM-GC (45).

En Latinoamérica, los primeros reportes de casos de infecciones por SARM-GC tuvieron lugar en Uruguay en el año 2001 (46). A partir de 2006 se comunicaron los primeros casos en Chile, correspondiendo a pacientes adultos (46). Debido a estos hallazgos, a partir de 2007 el Instituto de Salud Pública (ISP), Laboratorio de Referencia de dicho país, comenzó a realizar una vigilancia de laboratorio de este agente, incluyendo la confirmación microbiológica y caracterización molecular (46).

Para el año de 1998 se realizó en nuestro país, la primera caracterización molecular de este tipo de aislamientos (5). Sin embargo, recientemente Ocampo y colaboradores realizaron una caracterización molecular retrospectiva de 67 aislamientos SARM recuperados en 1994 en Medellín (47). Todos los aislamientos presentaron un SCC*mec* IV, con un subtipo no determinado, un tipo de spa t045 y un coeficiente de similaridad de 75,4% respecto al clon pediátrico (47). Estos resultados sugieren que los aislamientos SARM que circulaban en 1994 en Medellín posiblemente estaban relacionados con el clon pediátrico, aunque no es posible establecer su frecuencia real en esa ciudad y en el país.

En 2001, Gómez y colaboradores (47) reportaron la caracterización molecular de 76 aislamientos SARM recolectados entre 1996 y 1998 en Bogotá y Manizales, de los cuales 75 (98.0%) presentaron pulsotipos de PFGE estrechamente relacionados con el clon Pediátrico (>80% de similaridad) y fueron multirresistentes (resistencia a Gentamicina, ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina, rifampicina y clindamicina, principalmente) (5). Los resultados reportados por estos dos estudios sugieren que entre 1994 y 1998, los aislamientos SARM que circulaban en algunas ciudades de Colombia estaban relacionados con el clon pandémico Pediátrico (48).

Luego, Cruz y colaboradores (5), a partir de un análisis microbiológico y molecular (basado en PFGE) de 200 aislamientos SARM recolectados entre 2001 y 2003, encontraron que solo el 20% (n=40) estuvieron relacionados con el clon Pediátrico (5), mostrando una drástica disminución de la frecuencia de este clon respecto a los años 1994 a 1998; adicionalmente el 68.5% (n=137) de los aislamientos estuvieron relacionados con un nuevo clon denominado clon Chileno, el cual ya que había sido descrito anteriormente en Chile y

Argentina (48) y que comparte algunas características con el clon pandémico New York/Japón.

Las primeras infecciones documentadas por aislamientos SARM-GC en Colombia fueron identificadas en 2004 y 2005, en población pediátrica y adulta, respectivamente. Los cinco aislamientos SARM recuperados en los dos estudios (tres y dos, respectivamente) albergaron un *SCCmec* tipo IV y presentaron los genes *LukF/S-PV*, pero en los tres primeros, adicionalmente se encontró que tenían un subtipo IVc y tuvieron un tipo de secuencia ST8. Adicionalmente, con una caracterización posterior, los cinco aislamientos presentaron patrones de bandas o pulsotipos de PFGE relacionados con el clon pandémico USA300 descrito en Estados Unidos desde el año 2000, lo cual sugiere que tienen una estrecha relación genética con este clon (42). Sin embargo, el clon USA300 alberga un *SCCmec* IVa (IV.1.1.1) diferente al de los aislamientos colombianos IVc. Este hecho sugiere que los aislamientos SARM-GC en Colombia fueron generados por eventos genéticamente diferentes al surgimiento de este clon y de acuerdo a evidencia encontrada recientemente (49) por aislamientos sensibles relacionados genéticamente con el clon USA300 que adquirieron el *SCCmec* IVc en nuestro país.

Posteriormente, fueron realizados dos estudios prospectivos de infecciones SARM identificadas entre el 2006 y 2008 en varias instituciones hospitalarias del país, de los 318 aislamientos SARM analizados en el primer estudio, 100 (31,4%) correspondieron a SARM-GC (49); en el segundo estudio, de 250 infecciones SARM, 66 (26,4%) fueron ocasionadas por SARM-GC, pero interesantemente, 26 (39,3%) fueron identificadas en pacientes hospitalizados (50). Los dos estudios incluyeron una mayor caracterización

molecular de los aislamientos SARM-GC, con lo cual se logró obtener información adicional y confirmar los hallazgos encontrados previamente. La mayoría de los aislamientos SARM-GC en los dos estudios pertenecieron al ST8, albergaron un *SCCmec* IVc, los genes *lukF/S-PV*, *bsaA/B*, *seq*, *sek*, *eta*, que codifican para la Leucocidina de Pantón Valentine (PVL), el operón de Bacteriocina, enterotoxinas Q y K y toxina exfoliativa A, respectivamente; y no contenían el elemento móvil para el catabolismo de la arginina (ACME) (40).

En conjunto estos resultados pueden sugerir que los aislamientos SARM-GC hasta comienzos del 2008 aumentaron su frecuencia en infecciones SARM y comenzaban a generar infecciones dentro del ambiente hospitalario, convirtiéndose no solo en un problema de salud en la comunidad, sino también para las entidades de salud (40).

Posteriormente, tres nuevos estudios (51) con una amplia caracterización epidemiológica y molecular de aislamientos SARM fueron realizados, el primero por Jiménez y colaboradores en pacientes atendidos en tres hospitales de Medellín entre los años 2008 a 2010, incluyendo el análisis de 538 aislamientos SARM (51); el segundo por Márquez y colaboradores en pacientes pediátricos atendidos en quince instituciones de salud de Bogotá entre 2009 a 2011 e incluyó el análisis de 162 aislamientos SARM (5) y el tercer estudio realizado por Machuca y colaboradores en pacientes pediátricos atendidos en un hospital de Santander entre 2007 a 2009 e incluyó 53 aislamientos SARM (43).

Aunque en los resultados reportados en los tres (40) estudios existen diferencias significativas, en todos se encontraron frecuencias de aislamientos SARM-GC superiores al

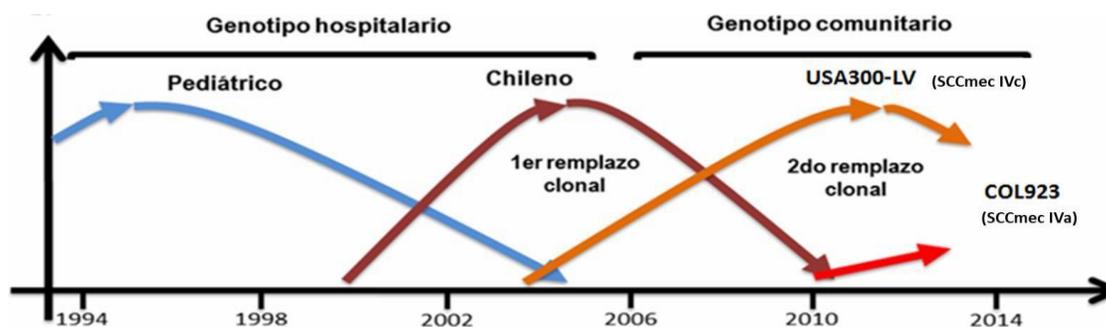
50% (58,7%; 95,1% y 79,0%, respectivamente). Estos resultados sugieren un nuevo reemplazo clonal, ahora dado por aislamientos SARM-GC-IVc en Colombia (40).

Por otro lado varios estudios han mostrado la colonización por este mismo clon IVc en pacientes hospitalizados y en personas de la comunidad (40) lo cual indica el alto éxito genético que tiene este clon. Recientemente, se ha reportado la detección y emergencia de aislamientos SARM-GC con nuevas características moleculares como un tipo de *SCCmec* IVa, un tipo de *spa* t1635, elementos genéticos móviles diferentes y pulsotipos de PFGE no relacionados ni con el clon USA300, ni con nuestro clon IVc (52).

De acuerdo al boletín informativo GREBO 2016 (53), la frecuencia de *S. aureus* en el 2015, en adultos en el servicio de UCI y hospitalización fue de aproximadamente 60% y 72% respectivamente, y en pediátricos del servicio de UCI 65% aproximadamente. Siendo el principal patógeno Gram positivo en hospitales. Por otra parte la resistencia de *S. aureus* a meticilina en los pacientes adultos procedentes del servicio de UCI fue menor (23,1%) a la reportada en el año 2014 (27,2%), y en el servicio de hospitalización fue de 35,1% donde se mantuvo estable frente a la reportada en el año 2014 (33,7%) observándose un perfil de resistencia compatible con el clon comunitario. Y en el servicio de UCI pediátrica la resistencia a la meticilina es superior a la encontrada en 2014 (34,8% vs 25,9%). Se observa un ligero aumento en la resistencia a clindamicina, al igual que la resistencia a trimetoprim sulfá. Este perfil de resistencia sugiere la consolidación de un reemplazo clonal del clon chileno por los clones de genotipo comunitario en las unidades de cuidado intensivo pediátricas (53).

Entre el 2008 y 2011 (8), se informó que la prevalencia del clon USA300-VL comprendió el 70% y 90% de las infecciones por SARM en adultos y pacientes pediátricos respectivamente. Sin embargo en un estudio realizado en el 2010 se identificaron aislamientos SARM-GC con diferencias moleculares y genéticas con respecto al clon USA300-VL, pero con similitud al clon COL923, un clon que fue identificado en cinco zonas geográficas de Colombia y que ha causado infecciones en niños desde el 2009 (8).

En vista de que la epidemiología de los SARM, es muy variante y de que actualmente en nuestro país vivimos una nueva ola epidemiológica asociada a clones comunitario (Figura 1), es de vital importancia realizar actividades de vigilancia epidemiología de estos clones para así poder determinar su frecuencia en infecciones causadas por *S. aureus*. Las Técnicas actuales de identificación y tipificación, como la determinación de SPA, SCCmec, PFGE y MLST, tiene varias desventajas entre las que se destacan: alto costo, alta complejidad y mayor tiempo; por ende es necesario la obtención de una herramienta que permita diferenciar rápidamente los clones de genotipo comunitario que circulan actualmente en nuestro país.



**Figura 1. Reemplazos clonales en Colombia.** : Esquema de los reemplazos clonales de SARM en Colombia, desde 1994 – 2014 Fuente: Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá. Análisis de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2013. Componente pediátrico y adulto. Bol Inf GREBO [Internet]. 2014;(6):40.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Generalidades de *Staphylococcus aureus*.

*Staphylococcus* spp representa un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Estos microorganismos pertenecen a la familia *Micrococcaceae*. Las especies se caracterizan por ser inmóviles, anaerobios facultativos, no forman esporas y generalmente no están capsulados (5). Pueden encontrarse solos o agrupados en forma de racimos (5,6). Este género tiene una gran capacidad de adaptación y propagación por lo cual permite colonizar y transmitirse entre la mayoría de mamíferos, siendo muy frecuentes los casos de infecciones entre humano-animales y viceversa (9).

*Staphylococcus aureus* es la especie más importante del género, la cual crece fácilmente en medios de cultivo no selectivos como el agar sangre, agar chocolate, agar cerebro corazón (BHI) y medios con grandes cantidades de NaCl (7,5%) (8,9). La mayoría de las cepas producen  $\beta$ -hemólisis alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre. Se diferencia de otros cocos Gram-positivos por la capacidad de producir enzimas termoestables como coagulasa y catalasa, y fermentar azúcares como el manitol (10).

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* tienen una amplia importancia clínica y son frecuentes en todos los servicios a nivel intrahospitalario, especialmente en la unidad de

cuidados intensivos (UCI). En la última década, según datos del grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá (GREBO), se ha observado que el microorganismo más frecuente en el servicio de UCI fue *S. aureus* (11); esto teniendo en cuenta que una proporción importante de pacientes se puede colonizar por este microorganismo posterior a su ingreso a UCI y que este patógeno es capaz de producir infecciones de piel, tejidos blandos, torrente sanguíneo y muchos órganos diferentes (10). Adicionalmente, vale la pena resaltar la gran preocupación que se tiene por la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, los antibióticos más utilizados en bacterias Gram positivas (12).

A principios de esta década se había observado en Colombia un remplazo de los clones circulantes, con predominio en los hospitales del clon chileno, el cual tenía un perfil de multiresistencia (resistente a B-lactámicos, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y quinolonas (12,13). Sin embargo, en los últimos 5 años ha incrementado la aparición de cepas de SARM en la comunidad en ausencia de exposición hospitalaria, teniendo una alta distribución en ambientes hospitalarios (13).

### **3.2. Factores de patogenicidad y virulencia**

*S. aureus* se ha caracterizado por poseer un gran número de factores de virulencia que lo hacen responsable de una amplia gama de infecciones que incluyen desde infecciones leves de piel y tejidos blandos hasta otras graves como la neumonía, la endocarditis y el choque tóxico. Estos factores de virulencia se ven relacionados con la evasión de la respuesta

inmune, estimulación de la respuesta inflamatoria, hidrólisis del ADN, adhesión celular, resistencia a antibióticos, etc. (9). Todas estas funciones se ven reflejadas en la Tabla 1.

<b>Componentes de la Estructura</b>	<b>Efecto biológico</b>
<b>Peptidoglicano</b>	Proporciona estabilidad osmótica y estimula la producción de pirógenos endógenos y es quimioatrayente leucocitario.
<b>Ácido Teicoico</b>	Regula la concentración catiónica de la membrana celular, se une a la fibronectina.
<b>Enzimas</b>	
<b>Coagulasas</b>	Convierte el fibrinógeno en fibrina
<b>Hiluronidasas</b>	Hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos.
<b>Fibrolisinas</b>	Disuelve los coágulos de fibrina.
<b>Lipasas</b>	Hidroliza los lípidos.
<b>Nucleasas</b>	Hidroliza el ADN
<b>Penicilinasas</b>	Hidroliza la penicilina
<b>Catalasas</b>	Transforman el peróxido de hidrogeno en agua.
<b>Proteínas</b>	
<b>Hemolisinas</b>	Proteínas, las cuales según el tipo de hemólisis pueden llegar a ser: Alfa (Causan lisis parcial de los eritrocitos) Beta (producen hemólisis total de los eritrocitos) y Gamma (No causan ruptura de eritrocitos). Son termolábiles y además de producir lisis de los eritrocitos pueden llegar a causar toxicidad para otras líneas celulares; bloquean la repolarización de la membrana plasmática, por lo cual generan contracción de la musculatura lisa y vasoconstricción.
<b>Proteína A</b>	Altera función ciliar, estimula respuesta inflamatoria, media en el daño tisular con producción de radicales tóxicos de oxígeno
<b>Leucocidina</b>	Es un tipo de toxina citolítica que contribuye a la formación de poros en la membrana de los polimorfos nucleares neutrófilos (PMN), lo cual le ayuda a <i>S. aureus</i> a la supervivencia dentro de los fagosomas leucocitarios
<b>Enterotoxinas</b>	Proteínas relativamente estables al calor y resistentes a enzimas proteolíticas. Suprimen la actividad del sistema inmunológico en cuanto a la producción de anticuerpos isotipo IgM y aumentan la susceptibilidad del paciente a generar shock.
Toxina del Shock tóxico (TSST-1)	<b>Causante de síndrome de shock toxico.</b>

**Tabla 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*** Fuente: Guadalupe Socorro Zendejas-Manzo, Héctor Avalos-Flores, Marisela Yadira Soto-Padilla. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, México. Rev Biomed 2014; 25:129-143(9).

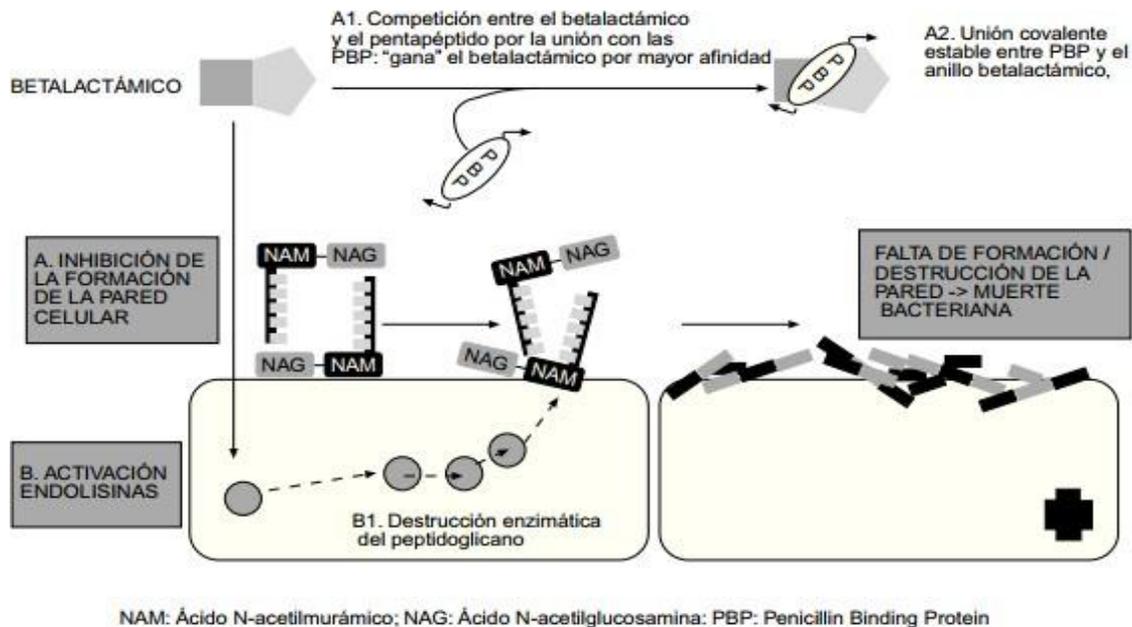
### 3.3. Mecanismo de acción de los B-lactámicos.

Estructuralmente los B-lactámicos están formados por un anillo, que consiste en una estructura heterocíclica de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno y según la naturaleza de los radicales se diferencian las distintas moléculas, siendo las cadenas laterales complementarias, las más relacionadas con su actividad antimicrobiana, farmacocinética y toxicidad (14). Son bactericidas parciales, ya que sólo actúan en fase de crecimiento celular y se caracterizan por inhibir la síntesis de peptidoglicano presente en la pared bacteriana. Tienen un espectro de actividad antimicrobiana que abarca a cocos Gram positivos, (excepto *Staphylococcus* resistente a meticilina) y BGN (Enterobacterias y no fermentadores) (15). En este grupo se incluyen las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos y los inhibidores de betalactamasas (12).

Los B-lactámicos producen su efecto principalmente a través de dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. La pared bacteriana es una estructura constante en las bacterias de todos los géneros, excepto los micoplasmas; se sitúa por fuera de la membrana citoplásmica y está compuesta principalmente por una proteína llamada Peptidoglicano (16). En las bacterias Gram positivas como *S. aureus*, la pared celular es gruesa y su componente principal es esa proteína. El esqueleto del peptidoglicano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman una malla o red (17). Los diferentes componentes del peptidoglicano se sintetizan en el

citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplásmica al espacio que hay entre esta y la pared celular (espacio periplásmico), donde se van ensamblando hasta formar la estructura en red. La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos (mediante la pérdida de uno de los aminoácidos terminales), para lo que se necesita la acción de unas enzimas que se localizan en ese espacio periplásmico, llamadas de forma genérica transpeptidasas (17).

El anillo betalactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular (figura 2). Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica. Por tanto, para que actúen los B-lactámicos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que este es el momento en que se sintetiza la pared celular (17).



**Figura 2. Mecanismo de acción de los B-lactámicos:** el pentapéptido compite con el anillo  $\beta$ -lactámico por la unión con las proteínas de unión a penicilina (PBP), en la cual gana el anillo  $\beta$ -lactámico por mayor afinidad. Esto evita la transpeptidación de las cadenas de Peptidoglicano, N-

acetilglucosamina (NAG) y N- acetil ácido murámico (NAM) provocando así la inestabilidad de la pared celular, la cual se destruye totalmente por activación enzimática de endolisinas imagen tomada de Suarez C. Antibióticos B-lactámicos.(17)

### **3.4. Mecanismo de resistencia a la meticilina.**

El elemento central de la resistencia a meticilina en *S. aureus* es la adquisición del gen *mecA*, que está integrado en el casete Estafilocócico Cromosomal *mec* (SCC*mec*). El gen *mecA* codifica una proteína de unión a penicilina de baja afinidad, llamada PBP2a. Esta proteína permite que en presencia de meticilina, se continúe la síntesis de pared celular a pesar de la inhibición de las PBPs normales, debido a que la PBP2a bloquea la unión de cualquier antibiótico  $\beta$ -lactámico a su sitio activo, ya que presenta la misma afinidad que una PBP de síntesis normal; esto permite que continúe el proceso de transpeptidación del peptidoglicano (18). La PBP2a es una transpeptidasa clase B, de alto peso molecular (78 kDa) que cataliza la formación de puentes cruzados en el peptidoglicano de la pared celular. Esta proteína toma el control de la función biosintética de la pared celular en presencia de  $\beta$ -lactámicos, cuando normalmente las PBPs son inactivadas al ligarse a estos antibióticos (19). Las cepas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina por este mecanismo, lo son también a todos los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas (a excepción de las nuevas cefalosporinas anti-SARM, ceftobiprol y ceftarolina) y carbapenemes (20).

### **3.5. Clasificación de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM)**

Desde su identificación en 1961, los aislamientos SARM estaban casi exclusivamente asociados con infecciones de origen hospitalario o asociados a contactos con el sistema de salud, pero desde 1990 se empezaron a identificar infecciones causadas por aislamientos SARM en personas en la comunidad, aparentemente sanas y sin presentar los factores de riesgo establecidos previamente para infecciones en el ambiente hospitalario (uso de dispositivos invasivos, hospitalizaciones, cirugías, infecciones previas por SARM, entre otros) (5).

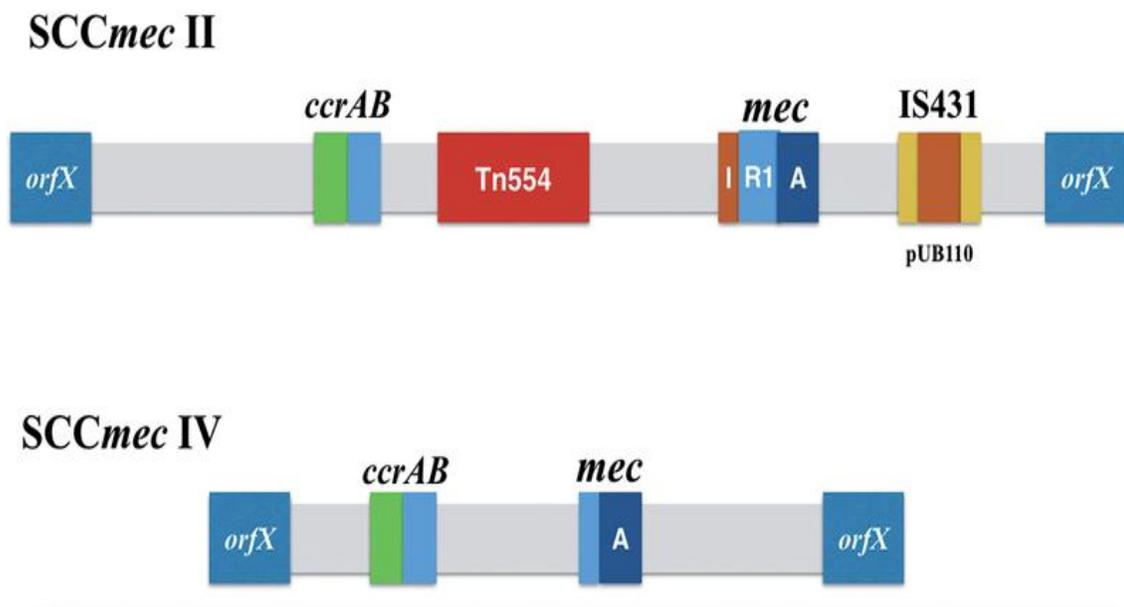
Inicialmente se crearon criterios epidemiológicos para poder identificar las infecciones SARM de origen comunitario e intuir de esta manera que posiblemente estas infecciones eran causadas por aislamientos de la comunidad (Tabla 2), a partir de esto se crearon los términos SARM de genotipo comunitario denominado con las siglas SARM-GC, es decir, aislamientos recuperados de infecciones de personas que provenían de la comunidad, o de pacientes con menos de 72 horas de ingreso hospitalario, sin antecedentes de hospitalizaciones, y junto con ciertas características moleculares y de virulencia específicas eran considerados como aislamientos SARM-GC (21). En contraste, los aislamientos que no cumplían con estos criterios y presentaban un perfil de multirresistencia y baja virulencia eran considerados como SARM de genotipo hospitalario SARM-GH (5).

Cepas SARM de genotipo hospitalario (SARM-GH)	Cepas SARM de genotipo comunitario (SARM-GC)
Resistencia a múltiples antibióticos	Resistentes por lo general solo a los antibióticos $\beta$ -lactámicos y ocasionalmente a Eritromicina
Contienen SCCmec Tipo I, II y III	Contienen SCCmec IV y V
Presentan una gran cantidad de toxinas	Presentan solo unas pocas toxinas en especial la Leucocidina Pantón-Valentine, enterotoxinas, Enzimas, proteínas, etc.
Producen una gran cantidad de procesos infecciosos.	Están inmersos en una gran cantidad de infecciones, pero especialmente en las de piel y tejidos blandos, neumonía necrotizante y septicemia.
Cepas aisladas en paciente con factores de riesgo nosocomiales.	Cepas aisladas tanto en pacientes que no tienen factores de riesgos nosocomiales (En la comunidad) como en pacientes relacionados con factores de riesgos nosocomiales (Nivel hospitalario)
Cinco clones pandémicos: Ibérico, Brasileño, Húngaro, Nueva York/Japón, pediátrico, chileno.	Dos clones pandémico principales: USA300 y USA 400

**Tabla 2. Características epidemiológicas inicialmente empleadas para la clasificación de los SARM adquiridos en la comunidad y en el ambiente hospitalario.**

Fuente: JA Bustos-Martínez, A Hamdan-Partida, M Gutiérrez-Cárdenas. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed 2006; 17:287-305(22)

Desde el punto de vista microbiológico las cepas SARM-GC son genéticamente diferentes del clásico *S. aureus* meticilina multirresistentes que se conoce del ámbito hospitalario (22). Poseen atributos de virulencia específicos. Primero, existe una exotoxina, la Leucocidina de Pantón-Valentine, habitualmente presente en menos de 5% de *S. aureus* y asociada con procesos inflamatorios severos en piel y partes blandas, así como en la neumonía necrotizante. Segundo, poseen mayor rapidez de duplicación celular y una alta capacidad de diseminación. Tercero, los genes de resistencia a meticilina se encuentran en una región de reciente identificación (SCC*mec* IV o V) distinta a la que poseen los SARM hospitalarios clásicos, que no contienen los genes de resistencia a antibióticos adicionales que son típicos de las cepas SARM-GH (Figura 3). Debido a esto sólo son susceptibles a los antibióticos B-lactámicos y ocasionalmente a la eritromicina (22,23).

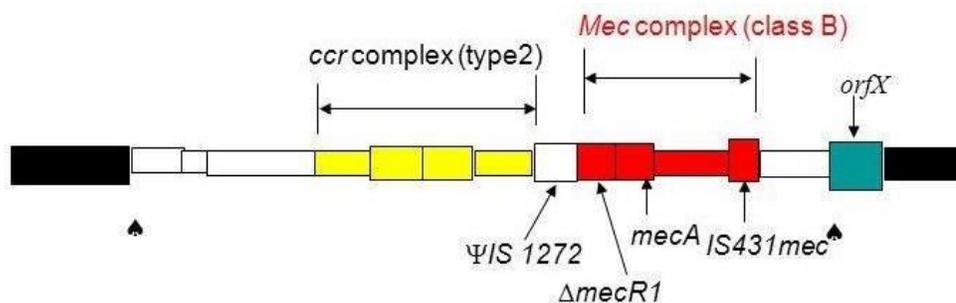


**Figura 3. Diferencias en el SCC*mec* de los aislamientos SARM-GC (SCC*mec* tipo IV) y SARM-GH (SCC*mec* tipo II).** La presencia de genes que codifican la resistencia a antibióticos no B-lactámicos es más frecuente en aislamientos de Genotipo Hospitalario. De color rojo se observa el Tn554 y de rojo-amarillo el plásmido pUB110 que son determinantes de otro tipo de resistencia (24).

Las cepas SARM-GC por lo general afectan a niños y adultos jóvenes, así como a deportistas sin factores de riesgo (23, 24). Hasta el momento, los aislamientos de los SARM descritos en pacientes de la comunidad son sensibles a múltiples antibióticos, siendo únicamente resistentes a los B-lactámicos. Las cepas SARM-GC se presentan en infecciones de mayor impacto clínico a diferencia de los SARM-GH, ya que las cepas comunitarias llevan genes de virulencia adicionales como: una exotoxina, la Leucocidina de Pantón Valentine, y una hemolisina Hla, habitualmente asociada con procesos inflamatorios severos en piel y partes blandas, así como en neumonía necrotizante, presente una toxina ligada al colágeno (25).

### 3.6. Características moleculares de SARM. Tipo y sub tipo de Casete Estafilocócico Cromosomal SCC*mec*.

El casete estafilocócico cromosomal *mec* (SCC*mec*) es un elemento genético móvil que lleva el gen de resistencia a la meticilina (*mecA*). Además del *mecA*, también lleva dos genes de recombinasa sitio-específica, casete recombinasa cromosomal A y B (*ccrA* y *ccrB*), y las secuencias de nucleótidos característicos en ambos extremos (Figura 4).



**Figura 4. Estructura del Casete Estafilocócico cromosomal *mec*.** De color amarillo se encuentra el complejo *ccr* que pueden ser del tipo 1 al 4. De color rojo se encuentra el complejo *mec* que alberga el gen que codifica la resistencia a meticilina (*mecA*), las regiones de color blanco indican inserciones, transposones o elementos genéticos móviles adquiridos para la resistencia a antibióticos. Fuente (24).

Después del primer reporte de este elemento, se han identificado muchos elementos de SCC*mec* estructuralmente distintos (26). Hasta la fecha, se han determinado secuencias de nucleótidos de más de 80 elementos SCC*mec* en especies *Staphylococcus*. Los elementos SCC*mec* identificados en *S. aureus* se clasifican basándose primero en la combinación de dos componentes esenciales, el complejo de gen *mec* y el complejo de gen *ccr*. Hasta el momento se han reportado once tipos (Tabla 3). La lista actualizada y la clasificación de SCC *mec* están disponibles en <http://www.SCCmec.org> o <http://www.staphylococcus.net> (27).

<b>Tipo de SCC<i>mec</i></b>	<b>Complejo de genes <i>ccr</i></b>	<b>Complejo de gen <i>mec</i></b>	<b>CEPAS ENCONTRADAS</b>
I	1(A1B1)	B	NCTC10442, COL
II	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
III	3 (A3B3)	A	85/2082
IV	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
V	5 (C1)	C2	WIS (WBG8318), TSGH17, PM1.
VI	4 (A4B4)	B	HDE288
VII	5 (C1)	C1	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
IX	1(A1B1)	C2	JCSC6943

**Tabla 3. Actualización y diferenciación de los tipos de SCC*mec*.** Fuente. International Working Group on the Staphylococcal Casete Chromosome elements. Disponible en línea (<http://www.SCCmec.org>)

### 3.7. Elementos Genéticos Móviles presentes en *Staphylococcus aureus*.

#### 3.7.1. Elemento móvil del catabolismo de la arginina.

El elemento móvil del catabolismo de la arginina (ACME) es un locus de 33 genes que contiene genes que permiten el catabolismo de arginina, un sistema de oligopeptidos permeasa (*opp*) y una poliamina N-acetil transferasa (*speG*). En USA300, ACME está genéticamente vinculado al casete estafilocócico cromosomal (SCCmec) tipo IVa (28).

Los principales grupos de genes identificados en ACME incluyen el *arc* (*arcA*, *arcB*, *arcC*, y *arcD*) y el oligopéptido permeasa (*opp*) (*opp-3A*, *opp-3B*, *opp-3C*, *opp-3D* y *opp-3E*). *arc* y *opp* son homólogos de genes que son factores reconocidos de virulencia bacteriana. Los genes *arc* de ACME codifican una vía completa de arginina deaminasa que convierte la L-arginina en dióxido de carbono, ATP y amoníaco (29).

A través de ACME, USA300 es más capaz de resistir el ambiente ácido de la piel, lo que implica una ventaja de colonización única para esta cepa, mejorando la aptitud y capacidad para colonizar la piel y las membranas mucosas. Una vez que la piel se coloniza, *S. aureus* puede romper la epidermis, dando lugar a las infecciones de piel y tejidos blandos (28). Los signos distintivos de estas infecciones incluyen una fase proinflamatoria rápida marcada por la infiltración de un gran número de leucocitos fagocíticos. Esta fase se caracteriza por una abundante producción de óxido nítrico (derivado de L-arginina) por fagocitos del huésped a los que se sabe que las cepas de *S. aureus* son resistentes (29). Después, sigue una fase pos inflamatorio, caracterizado por un aumento de la producción de poliaminas a

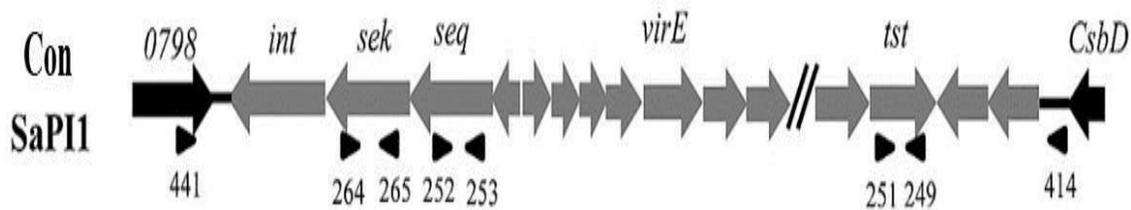
partir de L-arginina mediante la regulación positiva de Arginase-1 (*Arg-1*) derivada del huésped. El aumento de la producción de poliaminas es normalmente restrictivo al crecimiento de *S. aureus*, dada la sensibilidad de la mayoría de las cepas a estas moléculas. Sin embargo, los aislamientos de USA300 contienen codificado el gen *speG* en el elemento genético móvil ACME, que confiere resistencia a la toxicidad de poliaminas in vitro (28).

### 3.7.2. Islas de patogenicidad.

Los factores de virulencia de *S. aureus* son determinantes principales de la causalidad y la gravedad de la enfermedad durante el curso de la infección. Estos factores incluyen varias hemolisinas (a, b, gy d), leucocidinas, toxinas exfoliativas A y B, y la gran familia de superantígenos de toxinas pirogénicas (PTSAgs) (30). Estas toxinas incluyen la toxina del síndrome de choque tóxico 1 (TSST-1) y las enterotoxinas estafilocócicas (SE). Todos los PTSAg están codificados por elementos genéticos variables, con TSST-1 y enterotoxinas B y C, entre otros, presentes en islas de patogenicidad conocidas por sus sigla en inglés SaPIs (*Staphylococcus aureus* pathogenicity islands) (30).

#### **Gen *tst*:**

El gen *tst* se encuentra en la isla de patogenicidad 1 (**SaPI1**) y codifica una proteína conocida como TSST-1 (toxina del síndrome de choque toxico 1), es una toxina de 29,1 kDa (Figura 5). Cuando se libera TSST-1 en el torrente sanguíneo puede dar lugar a una variedad de condiciones clínicas graves, como el síndrome de choque tóxico (TSS), síndrome de muerte súbita del lactante y síndrome de Kawasaki (31).

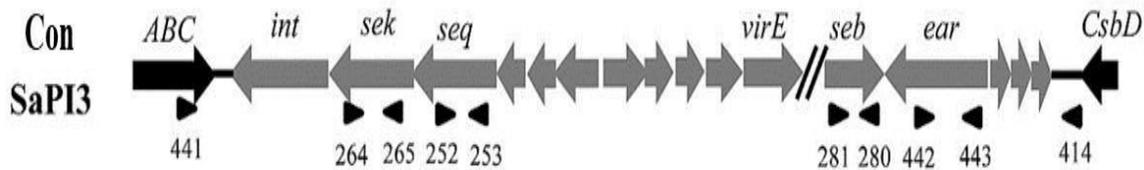


**Figura 5. Elemento genético de SaPI1.** Ubicación del gen *tst* en SaPI 1. Los números indican los códigos de los iniciadores usados en la amplificación del gen. Las flechas de color negro indican el sentido de cada iniciador (forward y reverse) (7).

El gen *tst* está presente en hasta el 70% de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con TSS. La potencia de TSST-1 reside en su capacidad para inducir eficientemente la proliferación y activación de células T (10.000 veces más eficaz que otros antígenos). Esto se debe a la liberación masiva de interleucinas y citoquinas como respuesta inmune frente a la infección (31).

### Gen *seB*

El gen *seB* se encuentra en la isla de patogenicidad 3 (**SaPI3**) y está presente en las cepas COL y codifica para la enterotoxina estafilocócica B (Figura 6). Esta enterotoxina forma parte del conjunto de proteínas que tienen una notable capacidad para resistir el calor y el ácido, son pirogénicas y comparten algunas propiedades importantes que incluyen la capacidad de inducir emesis y gastroenteritis, así como su notable súper antigenicidad (32).



**Figura 6. Elemento genético de SaPI3.** Ubicación del gen *seb*. Los números indican los códigos de los iniciadores usados en la amplificación del gen. Las flechas de color negro indican el sentido de cada iniciador (forward y reverse) (7)

Son resistentes a la inactivación por las proteasas gastrointestinales incluyendo pepsina, tripsina, renina y papaína. Debido a que SEB tiene dos dominios que poseen una estructura terciaria muy compleja y compacta permite que sea altamente resistente a las proteasas. Por lo tanto, pueden sobrevivir fácilmente a las bacterias que las producen, (32,33). La enterotoxina estafilocócica B es una de las enterotoxinas originariamente identificadas producidas por ciertas cepas *S. aureus*. Consiste en 239 aminoácidos y tiene un peso molecular de 28 kD. Es una de las proteínas de enterotoxina menos antigénicas que se han identificado (34).

### Genes *seq* – *sek*

Las enterotoxinas Q y K, están codificadas por los genes *seq* y *sek* respectivamente, y se encuentran en las islas de patogenicidad SaPI1, SaPI3, SaPI5 y en profago 3(35,36). La enterotoxina estafilocócica Q (SEQ) es una enterotoxina recientemente identificada, un miembro de la subfamilia del grupo V de superantígenos de toxinas pirogénicas, que había sido denominada SEIQ. En el año 2013 se informó que SEIQ exhibe actividad emética mediante ensayos realizados en monos, y por esta razón fue necesario modificar la denominación clásica “SEIQ” por SEQ según la nomenclatura estándar propuesta por el

Comité Internacional de Nomenclatura para superantígenos Estafilocócicos (INCSS) (35). Los estudios epidemiológicos han demostrado que los aislamientos de *S. aureus* procedentes de brotes de Intoxicación por estafilococos llevaban múltiples genes SE y / o codificadores SEI, y los más comunes fueron *sea*, *seb*, *seh* y *seq*. Molecularmente *seq* codifica un precursor SEQ con 242 aminoácidos de longitud (37).

Por otra parte la enterotoxina estafilococcica K (SEK), está codificada por un gen (*sek*) contenido en un SaPI, designado SaPI3, que también contiene el gen (*seb*) para SEB. *sek* también está presente en SaPI1 (38). Las propiedades bioquímicas y biológicas de estas dos enterotoxinas estafilococcicas Q y K son similares a las descritas anteriormente para la enterotoxina B (34,38)

### 3.7.3. Islas genómicas vSa $\alpha$ y vSa $\beta$

El término vSa se refiere a islas genómicas de tipo no fago y no SCC que están presentes exclusivamente en *S. aureus*, a menudo (pero no siempre) codifican determinantes de virulencia, se insertan en loci específicos en el cromosoma y se asocian con ADN intacto o remanente recombinadas. Las principales islas genómicas vSa, son vSa $\alpha$  y vSa $\beta$ , cada una de aproximadamente 20-30 kb, están presentes en todos los genomas de *S. aureus* secuenciados hasta ahora, pero ausentes en otras especies de *Staphylococcus*, incluyendo *S. epidermidis*. Aunque vSa $\alpha$  y vSa $\beta$  podrían haber sido adquiridos por transferencia horizontal de genes, en realidad no hay evidencia de que puedan moverse (37).

En la isla genómica vSa $\alpha$  se encuentra el gen *exo $\alpha$*  que codifica para la exotoxina alfa. Por otra parte la isla genómica vSa $\beta$  tipo I, se encuentra el gen *sem*, que codifica para la enterotoxina estafilococcica M, que posee las mismas propiedades biológicas y bioquímicas que las enterotoxinas mencionadas anteriormente. En vSa $\beta$  Tipo II se encuentran los genes *seo*, *sem*, *sek* que codifican para las enterotoxinas estafilococcicas O, M y K, respectivamente, *pvl* que codifica para la Leucocidina de Pantón valentín, y el gen *bsaB*, que codifica para Bacteriocina B (34,39)

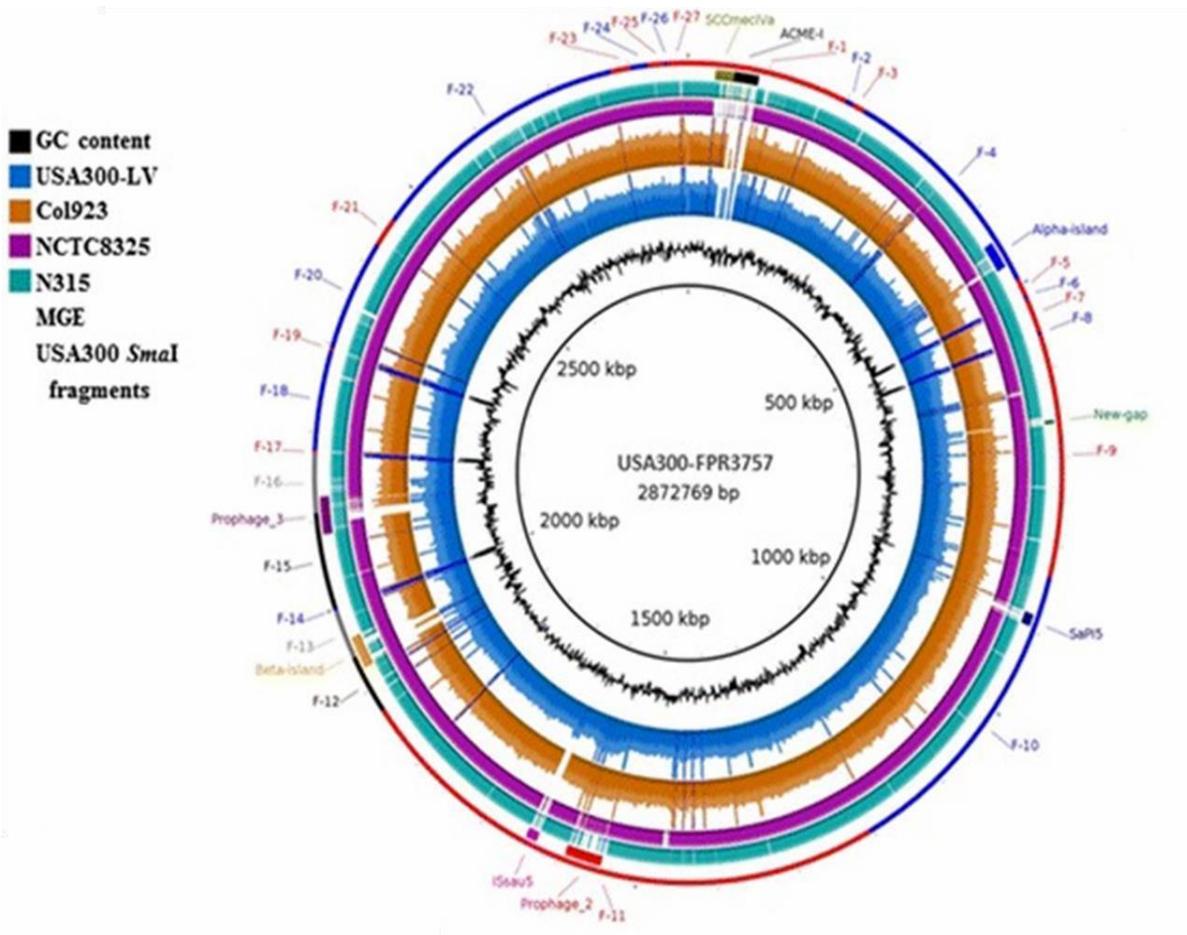
### **3.8. Características moleculares asociadas al clon COL923 y al clon USA300 VL.**

Los aislamientos asociados al clon COL923, presentan un SCC*mec* IVa, *agr* I, tipo de spa t1635 y presentan en la isla de patogenicidad 5 (SAPI5) de *S. aureus* inserciones de los genes *sek* y *seq* que codifican enterotixinas y una inserción de 54 pb en el gen *sausa300\_0808*, el cual codifica para una proteína hipotética, ninguno de estos aislamientos posee ACME y solo el 29% de los aislamientos codifica para la Leucocidina PVL (8).

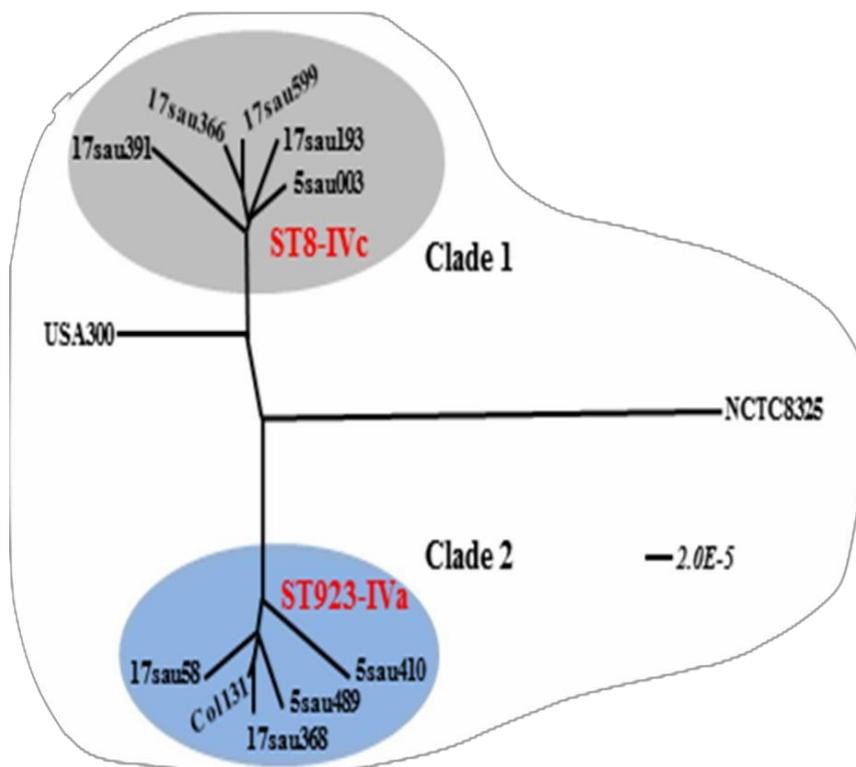
Por su parte el clon USA300 VL está relacionado con tipo de secuencia ST8, un SCC*mec* subtipo IVc y no presentan la inserción en el gen *Sausa300\_0808* (40). Los aislamientos USA300-VL difieren principalmente del clon USA300 por poseer la variante del casete de resistencia a la metilina (SCC*mec* IVc) y carecer del elemento móvil de catabolismo de la arginina (ACME) que se ha relacionado con la capacidad de supervivencia de este clon en condiciones extremas. Adicionalmente los aislamientos de USA300-VL que circulan

actualmente, presentan los genes *seq*, *sek* y *bsaA*, que codifican para las enterotoxinas Q, K y Bacteriocina A, respectivamente, con una frecuencia superior al 88%; tienen un tipo de proteína A (spa typing) t008 y un gen regulador accesorio (*Agr* por sus siglas en inglés) tipo1 (1).

En el 2017, Escobar y colaboradores reportaron las diferencias genéticas de aislamientos estrechamente relacionados con los clones en mención. En dicho estudio relacionaron el clon pandémico USA300 con la variante latinoamericana y el COL 923 encontrando diferencias notorias en los genomas en cuanto al SCC*mec* y en los EGM de Profago 3 ( $\phi$ 3), Profago 2 ( $\phi$ 2), la isla de patogenicidad de *S.aureus* 5(SAPI5) y B- Island (Figura 7). A su vez, se realizó un árbol filogenético, donde agruparon los aislamientos de estudio con los clones correspondientes (Figura 8) (7).

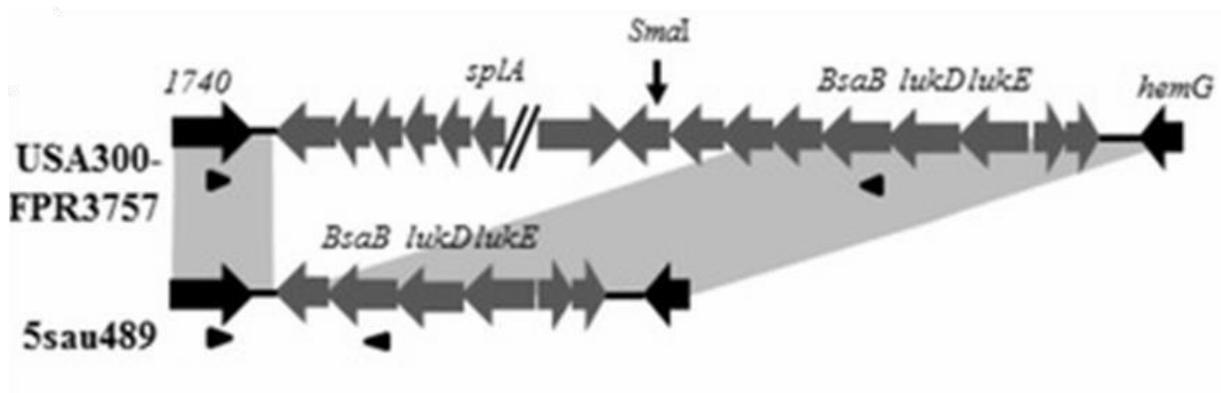


**Figura 7. Comparación de aislamientos relacionados genéticamente con los clones COL 923 y USA300- VL.** Mapeo de las secuencias del genoma de los clones en mención. Cada aislamiento está relacionado con un color diferente; el círculo negro del centro corresponde al clon pandémico USA 300. Las diferencias genéticas en los EGM, se evidencia por un espacio blanco que indica ausencia de la secuencia (7).



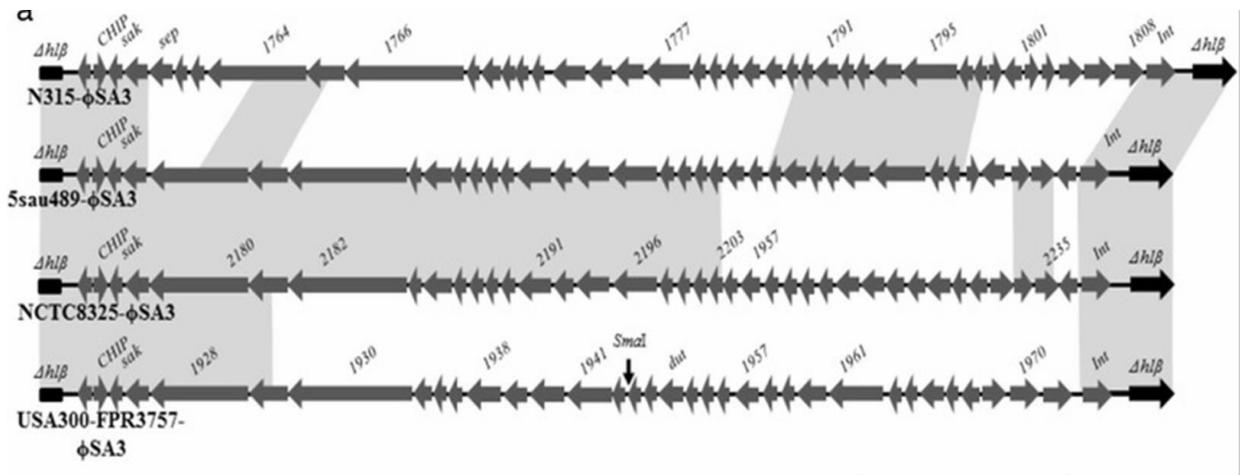
**Figura 8. Árbol filogenético que relaciona los aislamientos con su respectivo clon.** En el ovalo gris se encuentran los aislamientos relacionados con la Variante latinoamericana ST8 (Clado 1) y en el ovalo azul aquellos relacionados con el clon 923 (Clado 2). No se observó relación con la cepa SASM NCTC8325. (7)

Con el análisis del mapeo genómico se demostró que el clon COL923 posee características que difieren a los clones USA300 y USA300-VL, los cuales comprenden principalmente cambios en elementos genéticos móviles como en el profago 3, en la región J3 del *SCCmec*, SAPI5 y B- island la cual presenta una estructura truncada con un tamaño menor en el clon COL923 (13.980 pb) que en los clones USA300 y USA300-VL (37.590 pb) (Figura 9) (7).



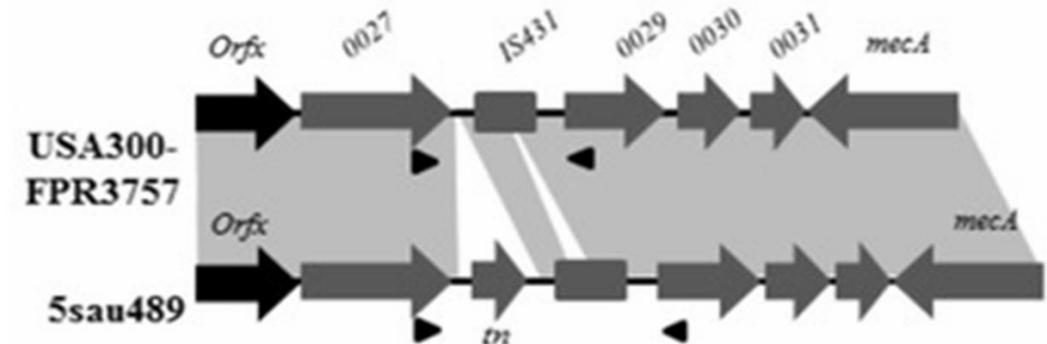
**Figura 9. Estructuras de la isla beta presente en el clon COL923 y USA300.** El tamaño de la isla beta en COL923 fue de 13.980 pb. Las regiones grises indican las secuencias idénticas entre las estructuras (7).

En el profago 3 ( $\phi$ SA3), se identificó que todos los aislamientos albergaron el gen *sak* (el cual es considerado como gen marcador de este profago), Sin embargo, se ha identificado que el clon COL923 presenta una nueva estructura genética que está más relacionada con la identificada en la cepa NCTC8325 con la cual tiene un 63,4% de identidad, mientras que con el profago 3 ( $\phi$ SA3) de los clon USA300 y N315 presenta una identidad baja de secuencia 38,4% y 39,6% respectivamente, como se observa en la figura 10. También es importante resaltar que este elemento genético móvil se inserta truncando el gen de la hemolisina (*hl $\beta$* ) y que contiene además genes relacionados a la evasión de la fagocitosis como las proteínas CHIP y la estafiloquinasa (SAK). (7)



**Figura 10. Estructuras del profago 3 presente en el clon COL923 (5sau489), USA300 y cepa N315.** Se identificó una nueva estructura en los aislamientos relacionados con el COL 923. Las zonas grises corresponden a las regiones que comparten las tres cepas (7).

Finalmente, se identificaron dos inserciones de ADN en la región SCCmec J3 que no están presentes en el clon USA300. La primera inserción es de 578 pb la cual contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codificaba una transposasa putativa, la cual se ha reportado previamente en aislamientos de genotipo comunitario perteneciente al ST72-SCCmec IVa de circulación en Corea del Sur. Y la segunda inserción en la región J3 de SCCmec que indican que el clon COL923 posee SCCmec IV diferente al del clon USA300, como lo indica la Figura 11. (7)



**Figura 11. Estructuras de la región J3 SCC mec presente en el clon COL923 (5sau489), y USA300.** El ORF identificado como *tn*, corresponde a la transposasa putativa, las flechas grises indican la orientación de lo ORF (marcas abiertos de lecturas), las regiones grises indican las secuencias idénticas o con más del 95% de similitud entre las estructuras (7).

### **3.9. Epidemiología de SARM en la comunidad.**

Después de los primeros caso de infecciones causadas por aislamientos SARM en la comunidad en aborígenes australianos en 1990 (26). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) reportó en 1997 la muerte de 4 niños de Estados Unidos por neumonías necrotizantes y sepsis causada por SARM. A partir de esta fecha se incrementó considerablemente el registro de casos de infecciones a nivel mundial por este tipo de aislamientos los cuales pertenecen a los cuatro clones pandémicos principales, el USA300 (ST8), USA400 (ST1), el asiático (ST30) y el europeo (ST80). Los cuales luego se diseminaron rápidamente también a nivel hospitalario generando un remplazo clonal de los SARM-GH que predominaban en este ambiente (41).

El clon USA300 es uno de los clones de SARM-GC más importantes en la actualidad, ya que posee un amplio perfil de virulencia y alta capacidad de supervivencia y adaptación a diferentes condiciones ambientales como baja concentración de oxígeno y restricciones nutricionales. Lo cual ha hecho que prevalezca y reemplace a otros clones de SARM-GH y e incluso a SARM-GC (como USA400) (42). A nivel epidemiológico se ha identificado que durante el año 2000 cerca del 87% de las infecciones causadas por *S. aureus* eran generadas por SARM-GC y de estas el 70% estaban relacionadas a USA300 (26). Posteriormente, se evidencio la presencia del clon USA300 en países con baja prevalencia de SARM como Dinamarca, Noruega y Holanda (43). Adicionalmente, se ha reportado casos de SARM-GC casi todos los países de Suramérica con características epidemiológicas, genéticas y moleculares bastante diferentes por ejemplo en Uruguay y

Brasil los aislamientos se asocian al clon pandémico New York/Japón presente también en Australia (*SCCmec IVc*, PVL positivo y ST30) y al clon pediátrico o USA-800 (*SCCmec IV*, ST5). En Colombia, Ecuador Bolivia y Venezuela se encuentra distribuida la variante latinoamericana del clon USA300 (USA300-VL) que poseen un *SCCmec IVc*, ST8 y PVL positivo, Es decir que hay muy poca frecuencia del clon USA300 en estas zonas del continente a pesar que existe un contacto o transito frecuente de individuos de estos países y Estados Unidos(38).

#### **4. PREGUNTA PROBLEMA**

¿Los principales clones de SARM-GC como USA300-VL y COL923 de circulación en Colombia presentan diferencias genéticas que permiten su clasificación por medio PCR?

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General.

Estandarizar una herramienta molecular que permita la rápida identificación y diferenciación de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina de Genotipo Comunitario (SARM-GC) pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL de circulación en Colombia.

### 5.2. Específicos.

- Determinar las condiciones óptimas de amplificación de los genes marcadores para cada los clones COL923 y USA300-VL de circulación en Colombia por medio de una PCR múltiple.
- Comparar la frecuencia de los elementos genéticos móviles (EGM) presentes en aislamientos clínicos de SARM-GC pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL, por PCR múltiple y amplificación individual.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental de tipo estandarización de métodos analíticos, en el cual por medio de la amplificación de genes específicos para los clones de SARM-GC USA300-VL y COL 923, permitió la diferenciación y clasificación genética en los aislamientos de circulación en Colombia.

**Universo:** Aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de circulación en Colombia

**Población:** Aislamientos de SARM-GC relacionados genéticamente con los clones USA300-VL y COL 923 de mayor importancia epidemiológica de circulación en Colombia.

**Muestra:** 106 aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de genotipo comunitario pertenecientes al cepario Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad del Bosque, recuperados a partir de hisopados nasales o procesos infecciosos en pacientes de diferentes instituciones hospitalarias de Colombia durante los últimos diez años.

***Criterios de inclusión:*** Los principales criterios de inclusión aplicados a esta investigación fueron:

- Aislamientos recuperados en los últimos diez años de instituciones hospitalarias en Colombia identificados como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina pertenecientes a los clones de interés de genotipo comunitario.
- Aislamientos que presentaron tipo y subtipo de SCC*mec* relacionado con el SARM-GC genotipo comunitario.
- Aislamientos que posean relaciones genéticas y epidemiológicas con los clones SARM-GC (USA300-VL y COL923).

### **Hipótesis**

***Hipótesis:*** La variabilidad genética de los clones USA 300-VL y COL923 de circulación en Colombia permiten su identificación y diferenciación por medio de la amplificación de genes marcadores.

## 6.2. Técnicas y procedimientos.

### 6.2.1. Extracción y cuantificación de ADN:

Para la obtención y purificación del ADN de las muestras seleccionadas de la colección de aislamientos del LGMB, se siguió el protocolo establecido en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB) de la Universidad El Bosque. Los aislamientos estudiados almacenados en crioviales a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fueron sembrados en medio BHI e incubados por 24 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron de 3 a 4 colonias, las cuales fueron resuspendidas en  $50\text{ }\mu\text{L}$  de buffer de lisis en un tubo eppendorf de  $0,6\text{ mL}$  (TRIS HCL  $1\text{M}$  pH  $8,0$ , EDTA  $0,5\text{M}$  pH  $8,0$ , sacarosa  $7\%$ , lisostafina  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y SDS  $1,25\%$ ) agitándose en vortex y con posterior incubación de 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posterior a la incubación, se adicionaron  $30\text{ }\mu\text{L}$  de agua destilada para obtener una buena separación de la capa acuosa y posteriormente se adicionaron  $100\text{ }\mu\text{L}$  de fenol cloroformo (relación 1:1), se sometieron a vortex y a centrifugación a  $10.000\text{ rpm}$  por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después de la centrifugación, se tomó con cuidado el sobrenadante y se pasó a un tubo de  $0,6\text{ mL}$ ; adicionando  $200\text{ }\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío al  $95\%$  e incubándolo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, luego se centrifugo nuevamente a  $10.000\text{ rpm}$  por 10 min. Se descartó todo el etanol, dejando secar los tubos boca abajo al lado del mechero para eliminar el exceso del mismo. Por último, se resuspendió el ADN en  $50\text{ }\mu\text{L}$  de agua destilada estéril para posteriormente almacenarlo en refrigeración a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, la cuantificación del ADN obtenido se realizó midiendo la calidad de la relación DO  $260/280$ ,  $230/260$  y densidad óptica a  $260\text{ nm}$  empleando  $2\mu\text{L}$  de muestra en el equipo NanoDrop ND1000c Spectropotometer.

### 6.2.2. Descripción de los aislamientos.

Para el proceso de estandarización se trabajó inicialmente con aislamientos controles: **Col 131, 20-Sau67 y 20-Sau333** para el clon COL 923; y **USA 300, 17sau73 y 24Sau370** para el USA 300VL, los cuales habían sido caracterizados previamente por el LGMB y están definidos como representantes de clon (Tabla 4).

<b>CARACTERÍSTICAS MOLECULARES</b>	<b>COL 131 (Asociado al clon COL923)</b>	<b>17sau003 (Asociado al clon USA300 –VL)</b>
Subtipo de SCC <i>mec</i>	IVa	IVc
Tipo de spa	t1635	t008
Presencia de ACME	-	-
Presencia de LukF/S-PV	+	+

**Tabla 4. Principales características genéticas y moleculares halladas en los controles usados para la estandarización de la PCR.** ST: Tipo de secuencia; spa: tipificación del gen spa que codifica la proteína A; y LuF/S-PV: genes que codifican la Leucocidina Pantón-Valentine (PVL), Amplificación de ACME.

Adicionalmente se analizaron 106 aislamientos clínicos, relacionados a los clones de interés asociados por su perfil de PFGE y perfil de resistencia, pero sin caracterización molecular completa de los elementos genéticos móviles, de los cuales 26 presentaban como fuente de colonización y 80 que provenían de infecciones entre las cuales estaban: infecciones del tracto urinario (ITU), septicemias, secreciones de heridas quirúrgicas, secreciones del tracto respiratorio (STR). Para la validación de la técnica se incluyeron 23 aislamientos sensibles.

6.2.3. Amplificación de los Elementos Genéticos Móviles de los Aislamientos clínicos por PCR individual.

Con el fin de confirmar la especificidad de la PCR múltiple y a su vez la frecuencia de estos elementos genéticos móviles (EGM) en los aislamientos SARM-GC se verifico la presencia de siete EGM por medio de PCR individual en la cohorte de asilamientos clínicos de SARM-GC. Para ello se emplearon los iniciadores indicados en la tabla 5, que permitieron la amplificación de los genes asociados a ACME (*Opp*, *arcC*), islas de patogenicidad SAPI1 (*tst*), SAPI 3 (*seb*) , SAPI 5 (*Sausa 0808*), isla genómica (vSaa), profago 2 (*pvl*) y profago 3 (*Sak*) en *S.aureus*.

Cod. Del Iniciador	Secuencia	Gen que amplifica	Tamaño a amplificar (Pb)	EGM asociado
GP 218	GGTTTAAATTATGCGGCGGA	<i>opp</i>	234	ACME
GP 219	AACTAGTGTTCCATGAGTGAT			
GP 220	GCAAATCTGTAAATGGTCTGTTC			
GP221	GCTGACGTTGCACTTTTCA	<i>arcc</i>	381	
GP 249	TGGATCCGTCATTCATTGTAA	<i>tst</i>	559	SAPI 1
GP 251	GCTTGCGACAACCTGCTACAG			
GP 280	TGCAGGCATCATATCATACCA	<i>seb</i>	421	SAPI 3
GP 281	TGTTTCGAGTCGAATTTAA			
GP 429	TTATCATGGCTCGCATTTTG	<i>sausa 0808</i>	Inserción: 228	SAPI 5
GP 430	GCGTTATCTTGGCTTTGGTC		No inserción: 174	
GP 264	ACTTTTTGGTAACCCATCATC	<i>sek</i>	624	SAPI 5
GP 265	GTGTCTCTAATAGTGCCAGC			
GP 252	CTAAATTTTGATTGCGCAACG	<i>seq</i>	253	SAPI 5
GP 253	TAGAGTACTCACTGTTAGCT			
GP 400	CCCTCAAGGTGAGCATGATA	<i>exo α</i>	300	vSaa
GP 401	ACTTTTCCGATGATTCATCAA			
GP 286	GCATCAACTGTATTGGATAGCAAAGC	<i>LukF/S-PV</i>	433	PROFAGO 2
GP 287	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGAT			
GP 417	GACTTCGATCTTTGCGCTTG	<i>sak</i>	200	PROFAGO 3
GP 418	GGCCCGTATTTGATGGTAAA			
GP 419	GACTTCGATCTTTGCGCTTG	<i>hlg</i>	No amplifica	
GP 420	GGCCCGTATTTGATGGTAAA		No la tiene: 475	
GP 258	TTCAGTTTCGACAGTTTTGTTGT	<i>sem</i>	376	SAB tipo 1
GP 259	CGGTGGAGTTACATTAGCAGGT			
GP 336	TTGGATTTGGCGAGGAATTA	<i>bsaB</i>	296	SAB Tipo 2
GP 337	AATTGTTGTCCCAGAAACCTG			

**Tabla 5: Lista de iniciadores utilizados para la amplificación de genes marcadores de los EGM en aislamientos de SARM-GC, diseñados y estandarizados previamente por LGMB de la Universidad El Bosque.**

La Amplificación de los EGM por PCR individual, se lograron gracias al estudio bioinformático previo reportado por el LGMB de la Universidad El Bosque, con los iniciadores específicos para cada gen (Tabla 6).

A su vez cada protocolo de amplificación ya estaba previamente reportado por el laboratorio. Se realizó para cada gen un corrido electroforético de 60 minutos con gel de agarosa al 1.7% y se revelaron los productos de amplificación con una tinción con bromuro de etidio por 20 minutos. Los productos de amplificación se evidenciaban con luz UV.

<b>EGM</b>	<b>GEN AMPLIFICADO</b>	<b>INICIADORES</b>	<b>PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN</b>
ACME	<i>arcC</i>	<b>GP 218 GP 219</b>	
	<i>Opp</i>	<b>GP 220 GP 221</b>	
SaPI 1	<i>tst</i>	<b>GP 249 GP 251</b>	
SaPI 3	<i>seb</i>	<b>GP 280 GP 281</b>	
SaPI 5	<i>Sausa 0808</i>	<b>GP 420 GP 430</b>	

VSα	<i>exo α</i>	GP 400 GP 401	<p>94°C 94°C 30 CICLOS 5min 30seg 50°C 30 seg 72°C 72°C 1min 7min</p>
PROFAG O 2	<i>luk F/SPV</i>	GP 286 GP 287	<p>95°C 95°C 25 CICLOS 5min 45seg 50°C 45 seg 72°C 72°C 2min 10min</p>
PROFAG O 3	<i>hemolisina</i>	GP 419 GP 420	<p>94°C 94°C 25 CICLOS 4min 30seg 53°C 30 seg 72°C 72°C 4min 4min</p>
SAB Tipo I	<i>sem</i>	GP 258 GP 259	<p>95°C 95°C 25 CICLOS 5min 45seg 50°C 45 seg 72°C 72°C 2min 10min</p>
SAB Tipo II	<i>sek</i>	GP 264 GP 265	<p>95°C 95°C 25 CICLOS 5min 45seg 50°C 45 seg 72°C 72°C 2min 10min</p>
	<i>bsaB</i>	GP 336 GP 337	
	<i>sem</i>	GP 258 GP 259	
	<i>luk F/SPV</i>	GP 286 GP 287	

**Tabla 6. Protocolos establecidos para la amplificación de los EGM por PCR individual. Fuente:** Tomado de la Carpeta de protocolos para la identificación de Elementos genéticos móviles en *Staphylococcus aureus*. Dra Zayda Lorena Corredor Roza. LGMB-Universidad El Bosque

#### 6.2.4. Diseño de PCR Múltiple

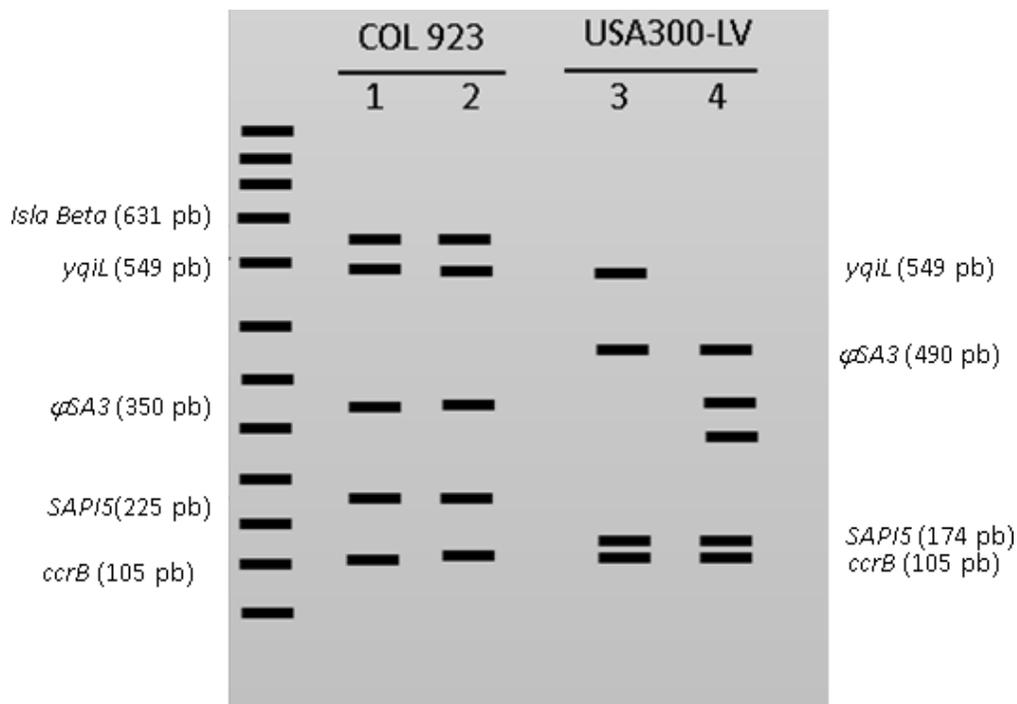
Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en los elementos genéticos SAPI5 (inserción en la proteína hipotética *Sausa 0808* para aislamientos COL923), Profago 3 (presencia de las toxinas sak y hlg), isla genómica B con la presencia del gen de la bacteriocina (*bsaB*), el corte diferencial del gen *yqil* con la enzima NdeI para los aislamientos relacionados con el ST8 (USA300-VL), y como control interno la amplificación del complejo *ccr* el cual confirma la presencia de aislamientos resistentes a meticilina con tipo de SCC*mec* IV, se estandarizaron las condiciones de amplificación en PCR múltiple. Para la estandarización se evaluaron diferentes condiciones como concentración de iniciadores, temperatura de anillamiento de los iniciadores y concentración de ADN. En la Tabla 7 se indican los iniciadores empleados, el gen de amplificación y el tamaño del amplimero para cada uno de los clones. Inicialmente estas condiciones fueron evaluadas con aislamientos controles de cada clon (COL131 y USA300).

Iniciador	EGM	Gen que está relacionado	Tamaño (Pb)	Clon
GP 429	SAPI 5	<i>Sausa 0808</i>	174	USA300-VL (Vlc)
GP 430			225	Clon 923 (Vla)
GP 532	PROFAGO 3	<i>Sak y hlg</i>	490	USA300-VL (Vlc)
GP 533				
GP 530	PROFAGO 3	<i>Sak y hlg</i>	350	Clon 923 (Vla)
GP 531				
GP 433	B- Island	<i>bsaB</i>	631	Clon 923 (Vla)
GP 529				
GP 534	<i>Yqil</i>	<i>yqil</i>	549	USA300-VL (Vlc)
GP 535			549	Clon 923 (Vla)
GP 193	Complejo <i>ccr</i>	<i>CcrB</i> (Control interno)	105	USA300-VL (Vlc)
GP 536			105	Clon 923 (Vla)

**Tabla 7: Iniciadores empleados en el diseño de la PCR múltiple con el gen que amplifica, su respectivo tamaño dado en pares de base (Pb) y el clon al cual se asocia. Fuente:** Tomado de la

Carpeta de protocolos para la identificación de Elementos genéticos móviles en *Staphylococcus aureus*. Dra Zayda Lorena Corredor Roza. LGMB-Universidad El Bosque.

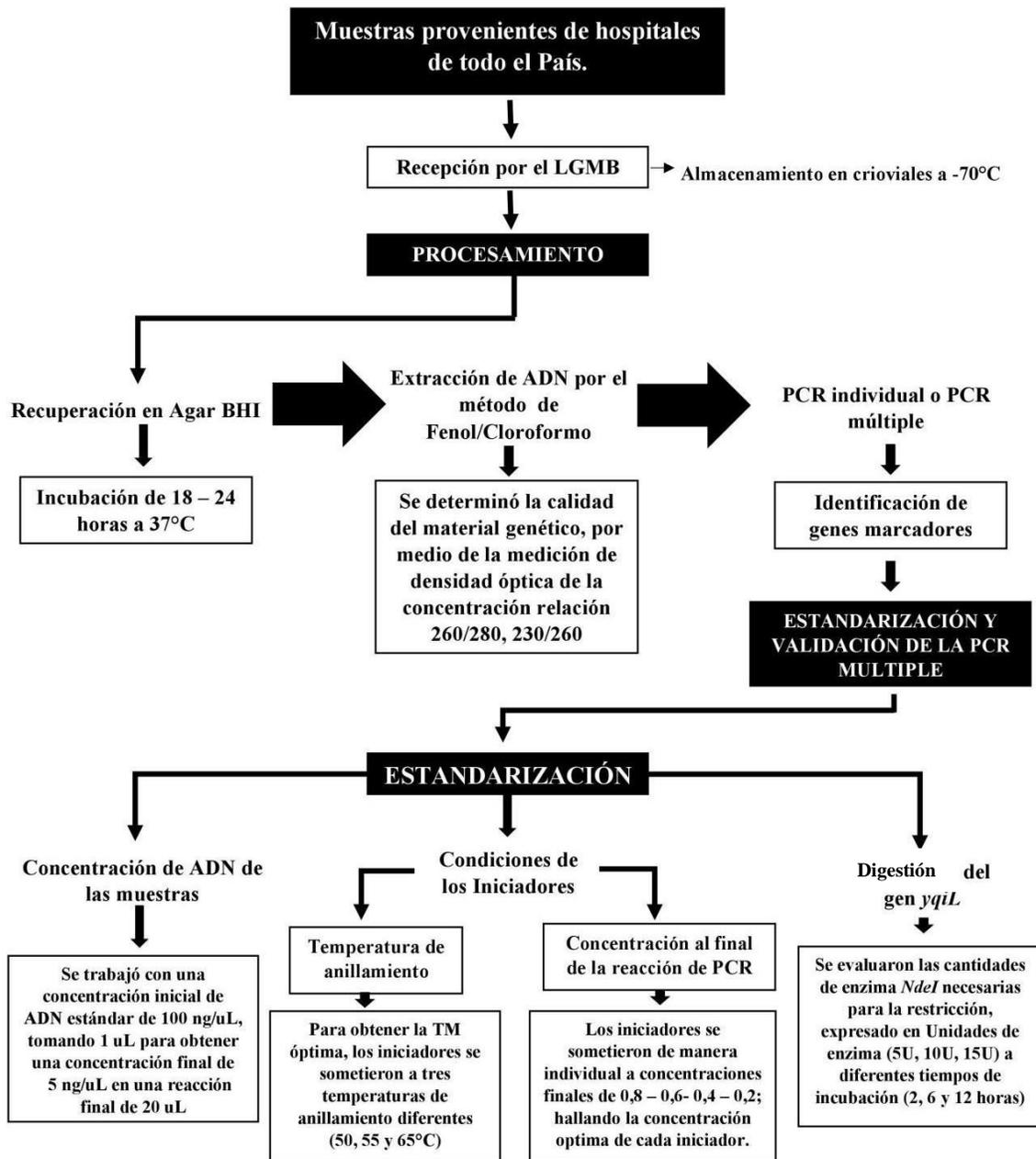
Las concentraciones evaluadas para los iniciadores se establecieron teniendo en cuenta cuatro concentraciones finales de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8µM; en PCR individual esto con el fin de establecer cuál es la concentración adecuada para la reacción de PCR y así evitar la formación de dímeros, inhibición de la reacción por exceso del mismo o inespecificidades. A su vez, cabe resaltar que partió de una concentración final de 0.5 ng/uL de ADN, en un volumen final de 20 uL de reacción para cada uno de los aislamientos. Una vez estandarizado la amplificación de cada uno de los genes de forma individual se procedió a establecer cuál era la temperatura de anillamiento más indicada para la reacción múltiple, para ello se evaluaron 50°C- 55°C- 65°C, teniendo en cuenta la temperatura consenso de todos los iniciadores. En La figura 12 se encuentran reflejados los productos de amplificación esperados con la estandarización de la PCR múltiple.



**Figura 12. Esquema diseñado de los amplimero esperados con la estandarización de la PCR múltiple:** Los carriles 1 y 3 muestran la amplificación esperada de los dos clones a estudiar. En los

carriles 2 y 4 se plasma la restricción esperada por los clones, se espera restricción del gen *yqiL*, en los aislamientos que estén estrechamente relacionados con el clon USA300- VL (Clon IV-c). **Fuente:** Realizado por los estudiantes Mario A. Laurens y James A. Anchico.

Después de estandarizado la PCR se procedió a determinar las condiciones más favorables para la restricción enzimática del gen *yqiL* con la enzima NdeI, la cual genera un corte en el amplimero del gen en los aislamientos IVc, En este proceso se evaluaron tres concentraciones distintas (5U, 10U y 15U) y diferentes tiempos de restricción a una temperatura de 37°C (2 horas, 6 horas y 12 horas). Los productos obtenidos de la PCR y de la restricción enzimática fueron separados y visualizados por medio de electroforesis de agarosa a una concentración del 2%, los cuales fueron sometidos a electroforesis por 70 minutos a 100 voltios y el gel fue coloreado con bromuro de etidio 0.02%. En la figura 12 se observa un diagrama de los productos esperados. En la figura 13 se encuentra estipulado el resumen metodológico.



**Figura 13. Resumen metodológico.** Fuente: Realizado por los estudiantes Mario A. Laurens y James A. Anchico.

## **7. RESULTADOS.**

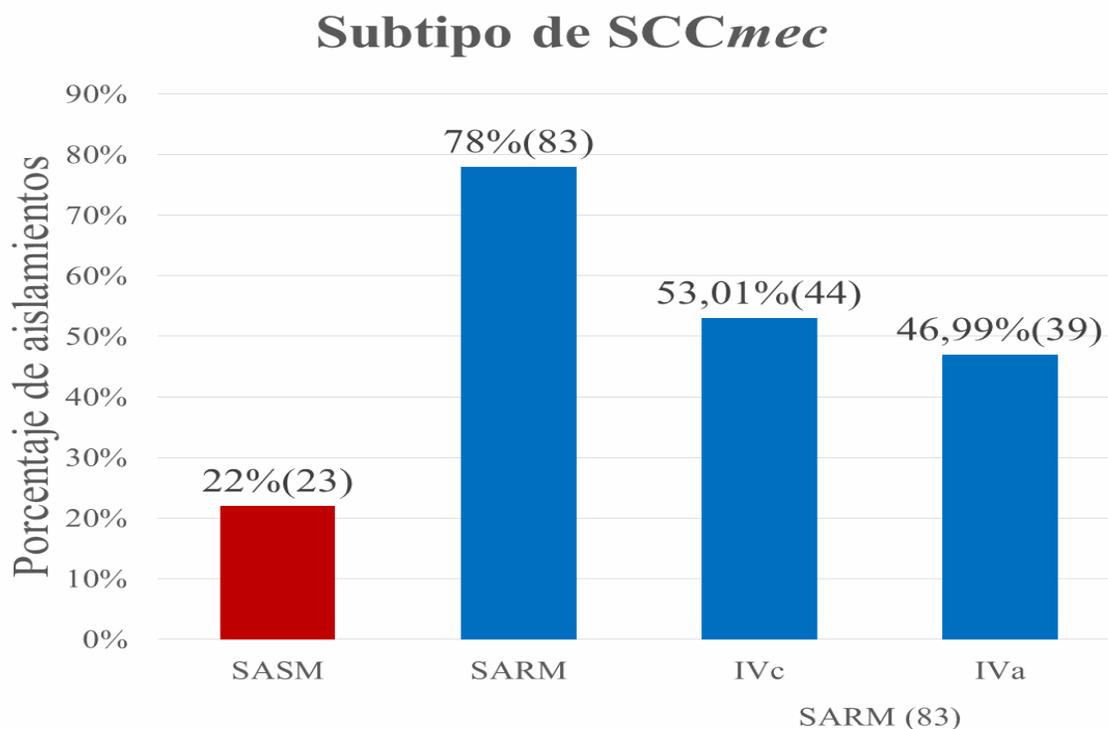
### **7.1. Caracterización de los aislamientos.**

Una vez obtenida con condiciones ideales de amplificación de estos genes, se procedió a evaluar una colección de aislamientos clasificados por otras técnicas moleculares relacionadas al clon COL923, USA300-VL y algunos sensibles a meticilina, con el propósito de comparar los resultados obtenidos por la PCR múltiple y la caracterización de estos EGM empleando otras estrategias de detección en la cual los iniciadores se ubican en regiones diferentes del cada gen a las empleadas en la multiplex.

#### **7.1.1. Fuente de los aislamientos pertenecientes al estudio**

Se revisó la procedencia de los aislamientos en las diferentes bases de datos del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque, con el fin de determinar la procedencia o fuente de cada uno de los aislamientos. Lo cual permitió identificar que de los 106 aislamientos, 26 (24.53%) fueron causantes de colonización y 80 (75.47%) fueron causantes de infección. De estos últimos 45 (56,25%) provenían de secreciones, 16 (20%) de Hemocultivos, 14 (17,50%) de Orina y 5 (6%) de secreciones de tracto respiratorio (STR). (Figura 14).



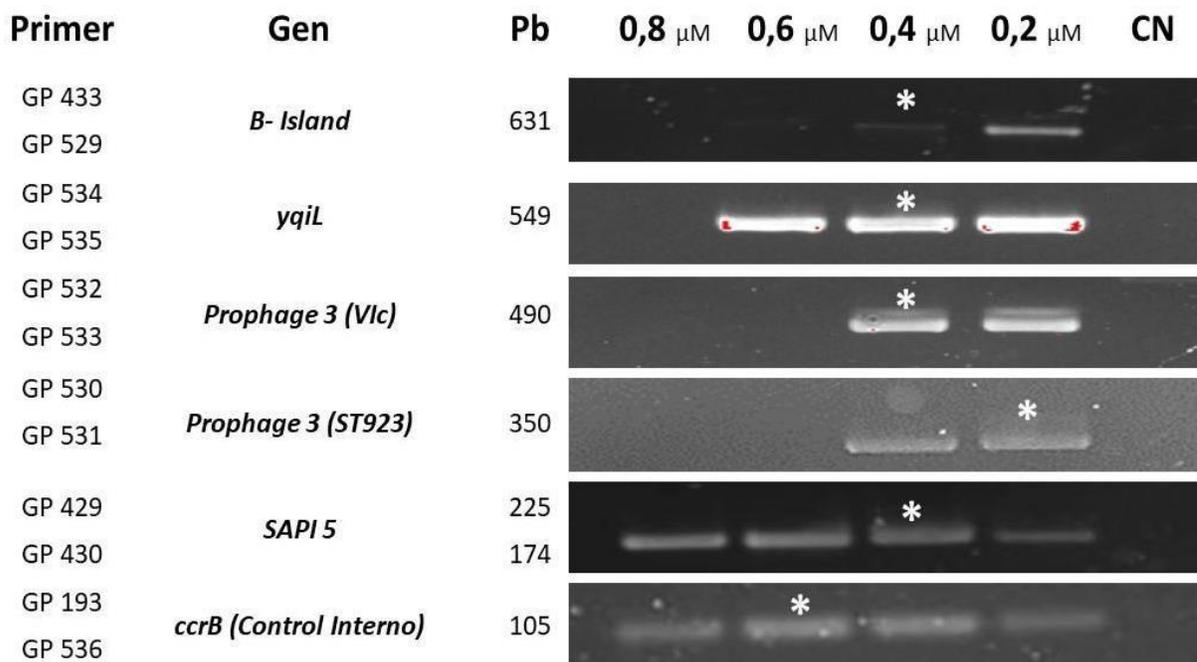


**Figura 15. Clasificación de los aislamientos por su tipo de SCCmec.** Los aislamientos resistentes a la meticilina (de color azul) presentaron una mayor frecuencia, 78% del total de los aislamientos a comparación de los sensibles a meticilina (de color rojo). De los resistentes a meticilina, los aislamientos con subtipo de SCCmec IVc presentaron una mayor frecuencia.

## 7.2. Estandarización PCR múltiple para la identificación de SARM-GC de circulación en Colombia.

En el proceso de estandarización de la PCR múltiple se evaluaron diferentes condiciones como concentración de iniciadores, temperatura de anillamiento adecuado para la amplificación de ADN empleado (0.5 ng/uL) con el objetivo de evitar saturación de ADN, lo cual podría generar inhibiciones o falsos negativos. Respecto a la concentración de iniciadores se evaluaron cuatro concentraciones (0,8 – 0,6 – 0,4 – 0,2 uM) para cada uno de los seis genes analizados como se observa en la Figura 16, y en la tabla 8 se observa las concentraciones seleccionadas para cada iniciador donde se observó la menor cantidad de

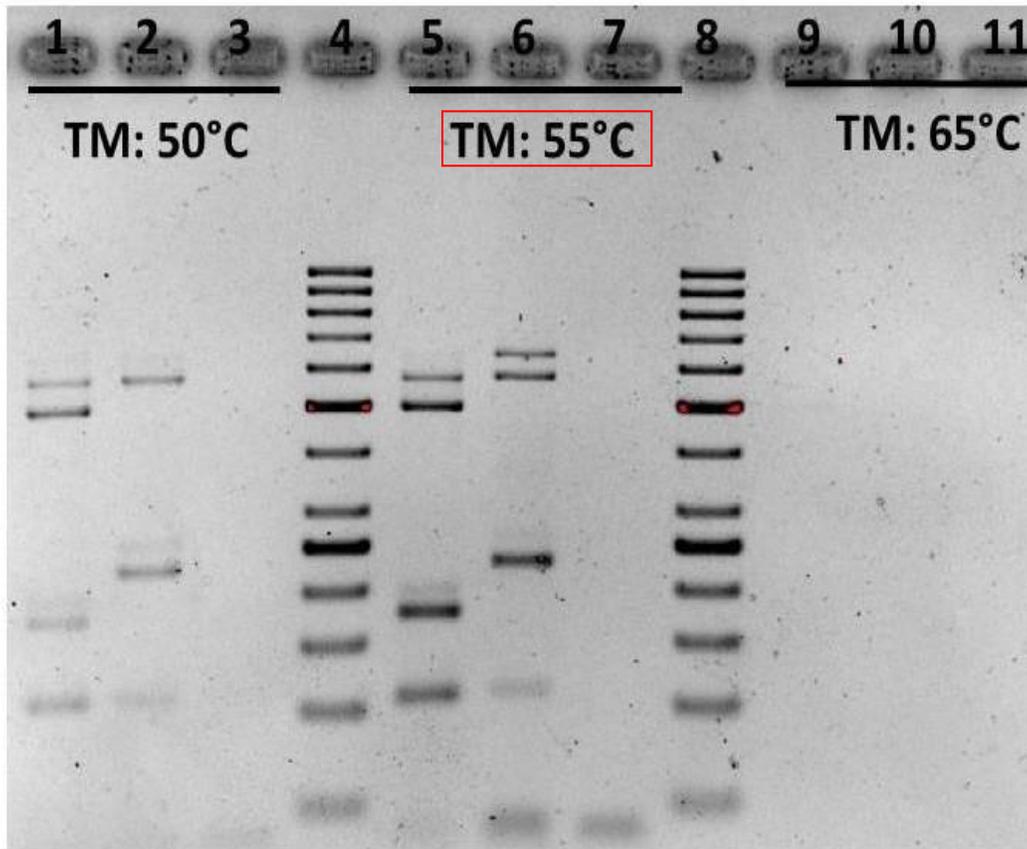
dímeros, inespecificidades, barrido e inhibición de la reacción por exceso de los mismos. El corrido electroforético se realizó en gel de agarosa al 2% de a 100 voltios por 65 minutos, utilizando dos controles y dos muestras con características epidemiológicas similares a los dos clones del estudio (Figura 16).



**Figura 16. Determinación de la concentración adecuada de cada uno de los iniciadores de la PCR múltiple.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para el análisis y determinación de la concentración en la reacción de PCR de cada uno de los iniciadores. Carril 1: concentración final de 0,8  $\mu$ M. Carril 2: concentración final de 0,6  $\mu$ M. Carril 3: concentración final de 0,4  $\mu$ M. Carril 4: concentración final de 0,2  $\mu$ M. Carril 5: control negativo de la reacción.

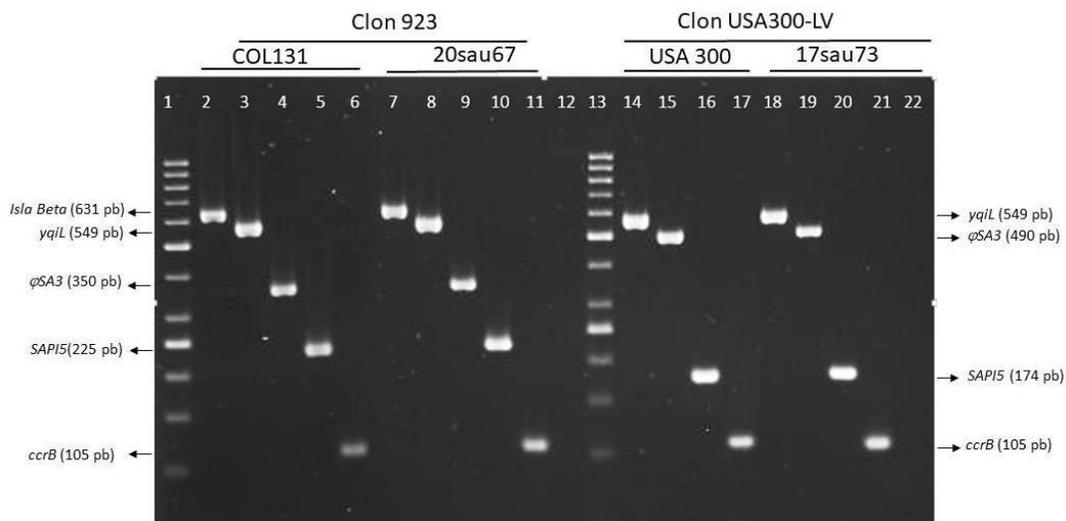
Se evaluaron diferentes temperaturas de anillamiento para garantizar la adecuada amplificación de todos los genes de manera simultánea sin favorecer las formaciones de inespecificidades, como se observa en la figura 17. Cabe resaltar, que este gradiente de temperatura fue seleccionado teniendo en cuenta la TM de cada iniciador suministrada por el proveedor en el inserto, la cual se puede evidenciar en el ANEXO 1. Se observó que la TM óptima para todos los iniciadores fue de 55°C, se puede evidenciar en la Figura 17 que a

esta temperatura hay una mejor amplificación de todos los genes evaluados en este estudio; a su vez no se observan inespecificidades de la reacción ni dímeros que pueden interferir con la lectura del gel.



**Figura 17. Determinación de la temperatura de anillamiento de los iniciadores usados en la PCR múltiple.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, para evaluar la temperatura de anillamiento adecuada en la amplificación conjunta de los genes; usando los controles para cada uno de los clones. **1:** USA300 a 50°C. **2:** Col 131 a 50°C. **3:** Control negativo de la reacción. **4:** MPM50pb. **5:** USA300 a 55°C. **6:** Col 131 a 55°C. **7:** Control negativo de la reacción. **8:** MPM 50pb. **9:** USA300 a 65°C. **10:** Col 131 a 65°C. **11:** Control negativo de la reacción.

En la figura 18; se observa la implementación de las condiciones estandarizadas para cada uno de los iniciadores, pero con controles asociados genéticamente a cada uno de los clones de SARM-GC.

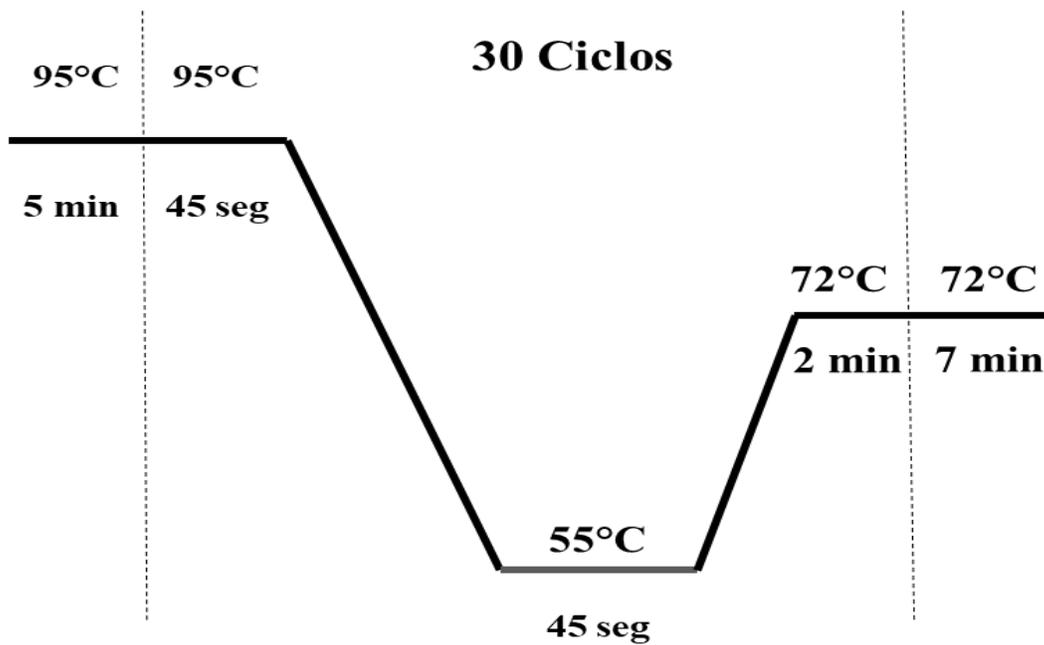


**Figura 18. Elementos Genéticos de los Clones 923 y USA300-VL a concentraciones de iniciadores previamente establecidas de manera individual.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio para la evidenciar los genes evaluados en la PCR múltiple. **1:** MPM 50pb. **2:** *Isla Beta* COL 131. **3:** *yqiL* COL 131. **4:** *φSA3* COL 131. **5:** *SAPI5* COL 131. **6:** *ccrB* COL 131. **7:** *Isla Beta* 20sau67. **8:** *yqiL* 20sau67. **9:** *φSA3* 20sau67. **10:** *SAPI5* 20sau67. **11:** *ccrB* 20sau67. **12:** Control de reactivos. **13:** MPM 50pb. **14:** *yqiL* USA300. **15:** *φSA3* USA300. **16:** *SAPI5* USA300. **17:** *ccrB* USA300. **18:** *yqiL* 17sau73. **19:** *φSA3* 17sau73. **20:** *SAPI5* 17sau73. **21:** *ccrB* 17sau73. **22:** Control de reactivos

Después de un correcto proceso de estandarización, con el estudio de varias condiciones, se pudo obtener el siguiente protocolo para la PCR:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN DE LA REACCION	VOLUMEN PARA UNA REACCIÓN
Dream Taq Buffer	10 X	1 X	4 µL
DNTP's	20 µM	0,5 µM	0,4 µL
Dream Taq ADN Polimerasa	5000 U	5 U	0,2 µL
MgCl <sub>2</sub>	20 µM	2 µM	2,4 µL
GP 193 GP 536	16 µM	0,6 µM	0,7 µL
GP 530 GP 531	4 µM	0,2 µM	0,7 µL
GP 429 GP 430	16 µM	0,4 µM	0,5 µL
GP 433 GP 529	8 µM	0,2 µM	0,5 µL
GP 532 GP 533	8 µM	0,4 µM	0,5 µL
GP 534 GP 535	8 µM	0,4 µM	0,5 µL
ADN	100 ng/µL	0,5 ng/µL	1 µL
H <sub>2</sub> O	-	-	8,6 µL
<b>TOTAL</b>			<b>20 µL</b>

**Tabla 8.** Concentraciones de reacción, concentraciones iniciales y volúmenes a tomar en cada uno de los reactivos.



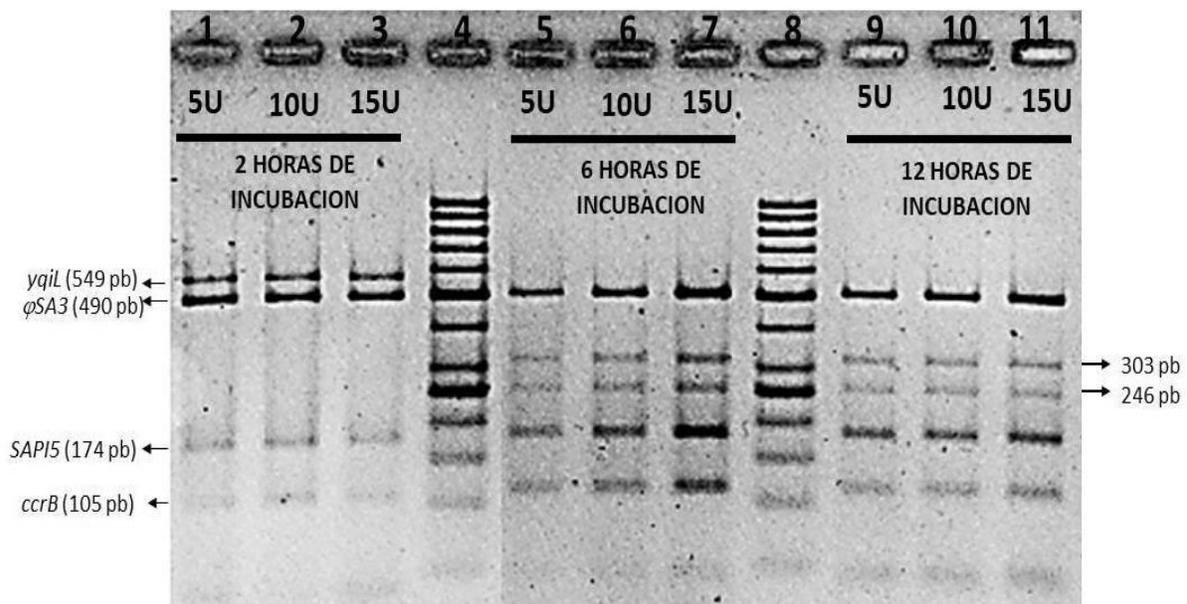
**Figura 19. Ciclo definido de la PCR múltiple**

### **7.3. Condiciones para la Digestión del gen de la Acetil coenzima A acetiltransferasa (*yqiL*)**

En los dos clones se amplificó el gen *yqiL* que es constitutivo de especie el cual se usó como control interno de la PCR y adicionalmente, permite diferenciar el ST923 de los demás ST, incluyendo el ST8, por medio de la restricción enzimática con la enzima NdeI, la cual realiza un corte en todos los alelos reportados para el gen *yqiL*, incluyendo el ST8 (USA300-VL), excepto en el alelo 109, el cual está dentro del ST923. Este corte genera dos productos de restricción de 303pb y 246pb. En el gen de *yqiL* de los aislamientos pertenecientes al ST923 (COL923) no se produce ningún corte enzimático. Para estandarizar este ensayo de restricción se sometió el producto de amplificación de la PCR

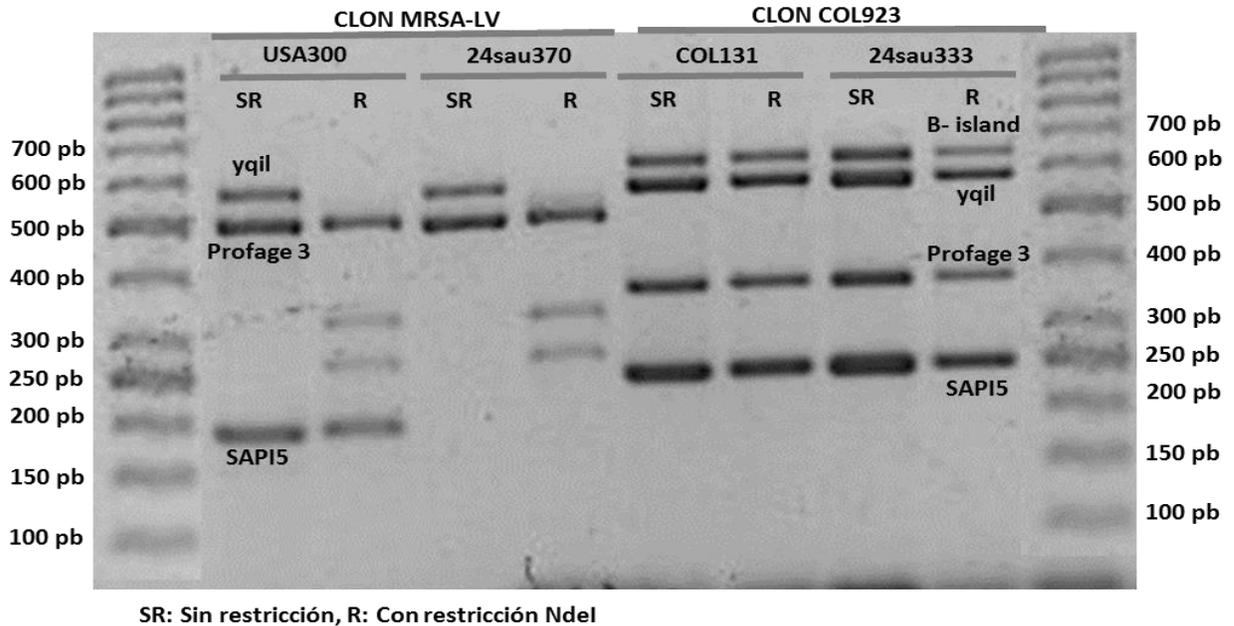
múltiple a varias concentración de la enzima de restricción NdeI (Expresada en unidades de enzima) y a diferentes tiempos de incubación de la reacción a 37°C.

En las concentraciones de enzima de 5U, 10U y 15U no evidenciaron diferencias significativas en sus respectivos resultados (Figura 20), por lo cual se seleccionó una concentración de 5U de enzima necesaria para la digestión. En cuanto al tiempo de incubación de la reacción, se evidenció una digestión total del gen a partir de las 6 horas de incubación; al igual que los productos de la restricción (Figura 20).



**Figura 20. Estandarización de la Digestión del gen *yqiL* con enzima NdeI.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio para evidenciar las condiciones establecidas para la restricción. **Del carril 1-3:** concentraciones de enzima (5U-10U-15U) sometidas a 2 horas de incubación. **Carril 4:** MPM 50 pb. **Carril 5-7:** concentraciones de enzima (5U-10U-15U) sometidas a 6 horas de incubación. **Carril 8:** MPM 50 pb. **Carril 9-11:** concentraciones de enzima (5U-10U-15U) sometidas a 12 horas de incubación.

Posterior a la estandarización de la digestión del gen *yqiL*, se implementaron las condiciones seleccionadas en controles asociados genéticamente a cada uno de los clones de SARM-GC (Figura 21).



**Figura 21. PCR múltiple para la identificación clon COL923 y USA300-VL.** SaPI5: Isla de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*,  $\phi$ SA: Profago 3 de *S. aureus*, vSa $\beta$ : Isla genómica beta *S. aureus* yqil. Acetyl coenzyme A acetyltransferase.

#### 7.4. Evaluación de la frecuencia de los Elementos Genéticos Móviles (EGM) en todos los aislamientos.

Mediante PCR convencionales, se evaluaron nueve EGM relacionados genética y epidemiológicamente con los clones COL923 y USA300VL; determinando a su vez los genes marcadores útiles para la amplificación múltiple a estandarizar.

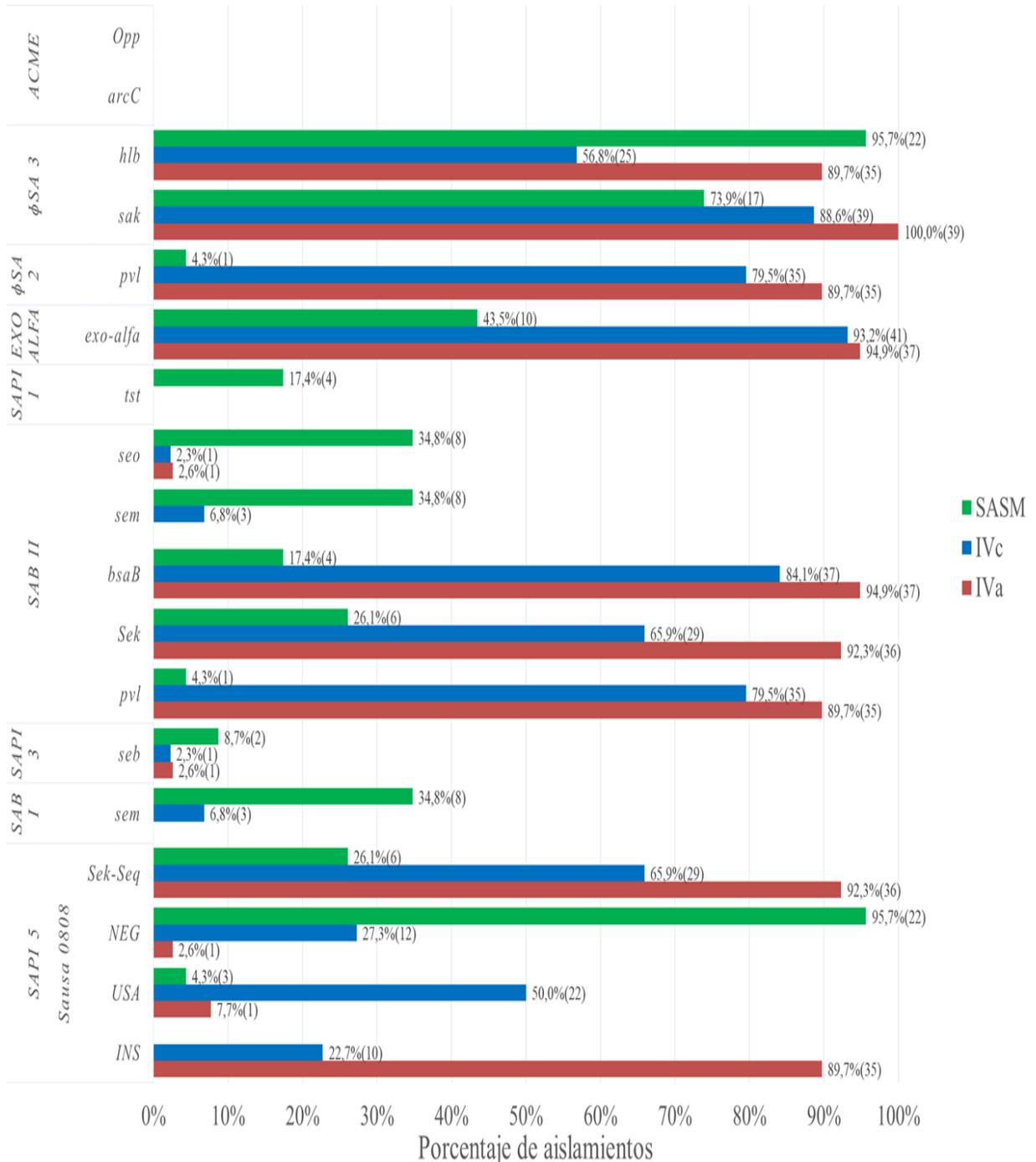
En los aislamientos relacionados con el clon COL923, los EGM más frecuentes fueron SAPI 5, Profago 3, Profago 2 y Exo Alfa. Por su parte, los de EGM con mayor frecuencia en USA300- VL fueron SAPI 5, Profago 3, Profago 2 y SAB II. Y para los sensibles el mayor comportamiento estuvo ligado a los genes de *hly* en Profago 3 y *sem* y *seo* para las islas genómicas de *S. aureus* tipo I y II. Al evaluar la presencia de los EGM se observó que el EGM más frecuente fue Profago 3. Es de resaltar que en ningún aislamiento se presentó

ACME (Figura 22). Se encontraron diferencias significativas en los EMG SAPI5 (Inserción de la proteína *Sausa 0808* en los aislamientos VIa y no inserción de la misma en los aislamientos VIc) y en  $\phi 3$  debido a que presentan características moleculares específicas que permiten evidenciar diferentes tamaños en el corrido electroforético para cada clon (Figura 22).

El comportamiento de los EGM en los aislamientos sensibles a meticilina (SASM), mostraron poca relación con los elementos genéticos móviles evaluados durante el estudio, ya que su frecuencia no fue significativa con relación a las otras dos poblaciones de aislamientos; por lo que se decidió utilizarlos como validación de la estandarización de la PCR.

## ELEMENTOS GENETICOS MÓVILES

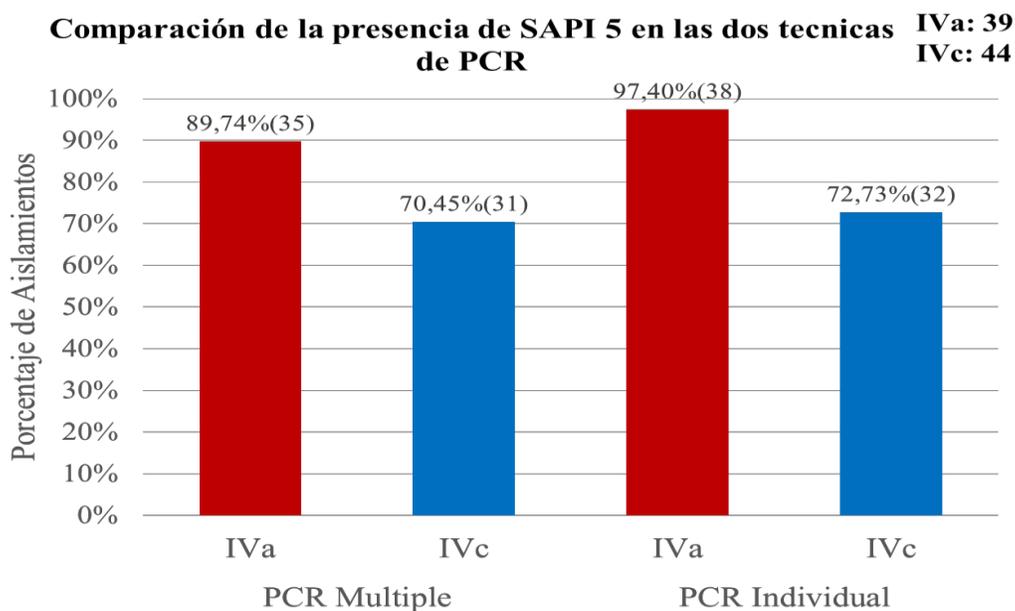
SASM: 23  
IVc: 44  
IVa: 39



**Figura 22. Elementos Genéticos Móviles.** Se observan todos los elementos genéticos móviles evaluados en las tres poblaciones pertenecientes al estudio; con diferencias significativas en SAPI 5 y  $\phi 3$  en los aislamientos resistentes a meticilina VIa y VIc; en cuanto a su frecuencia y características genéticas. Los aislamientos sensibles a meticilina múltiple, mostraron poca relación con los EGM evaluados. No se observó ningún aislamiento relacionado con el EGM ACME.

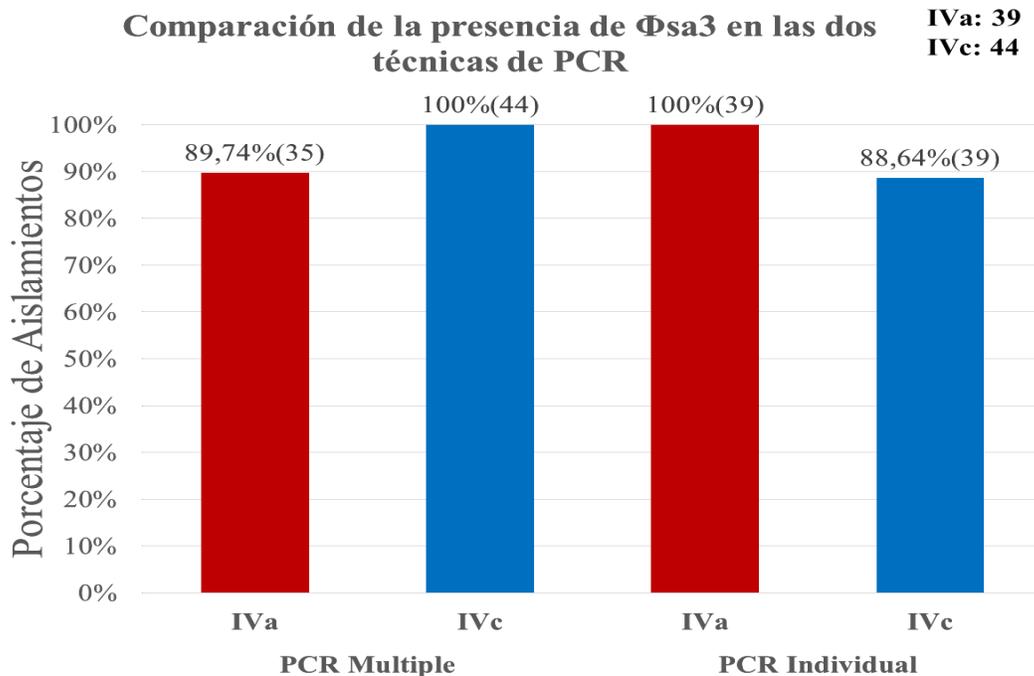
Con el fin de verificar la prevalencia de los aislamientos en las técnicas de PCR (individual y múltiple) se compararon los resultados obtenidos (Figura 23,24 y 25), donde se obtuvo una alta similitud entre las dos técnicas, lo cual indica que la técnica estandarizada si logro amplificar correctamente los genes asociados a los EGM.

En el EGM de SaPI5 se observó un perfil diferencial en la técnica de PCR múltiple por la evaluación de la amplificación de la proteína hipotética que presenta una inserción de 54 pb en los aislamientos IVa con un 89.74% y los IVc que no presentan esta inserción con un 70.45% (Figura 23).



**Figura 23. Comparación de la presencia de SaPI 5 en las dos técnicas de PCR.** En la PCR múltiple se identifica la presencia de la inserción en la proteína hipotética Sausa0808 con un tamaño de amplificación de 228 pb para el clon COL 923, en la caracterización tradicional se analizó la presencia adicionalmente de sek y seq

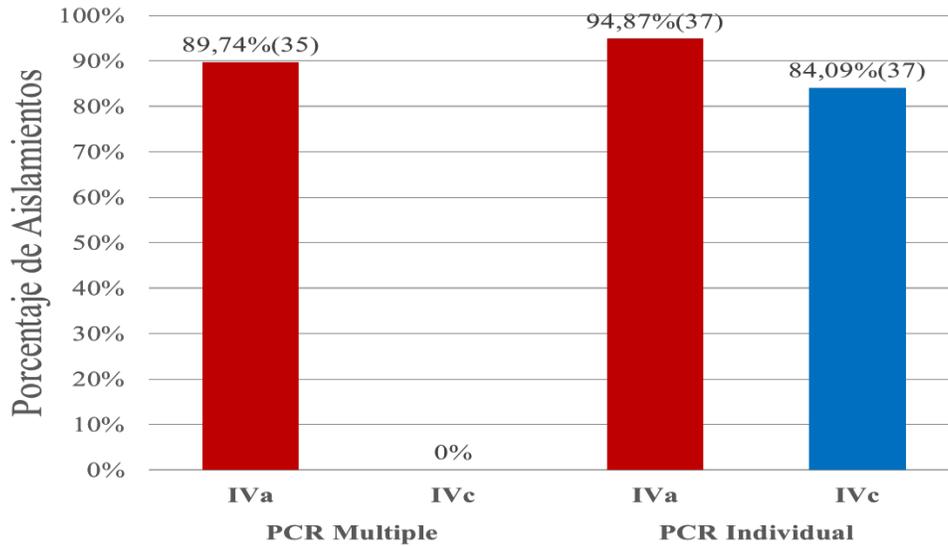
En la figura 24, se observó una totalidad de los aislamientos IVc y IVa con el EGM de profago 3 en las técnicas de PCR múltiple y PCR individual, respectivamente.



**Figura 24. Comparación de la presencia de  $\phi$ sa3 en las dos técnicas de PCR.** En la estrategia tradicional se evaluó la presencia de sak y la presencia de la hemolisina Hlg que no está presente en los aislamientos COL923.

En la figura 25 es importante resaltar que los iniciadores empleados para la identificación del EGM B-island, son diferentes para cada técnica teniendo en cuenta que para los aislamientos de subtipo de casete IVc, este elemento tiene un tamaño de 37.590 pb por ende los iniciadores empleados en la PCR múltiple van dirigidos a la B-island de los aislamientos IVa los cuales presentan la deleción del fragmento dando como resultado un tamaño final desde 13.980 pb, El cual permite la amplificación del fragmento por proximidad del ORF 1740 y el gen *bsaB*.

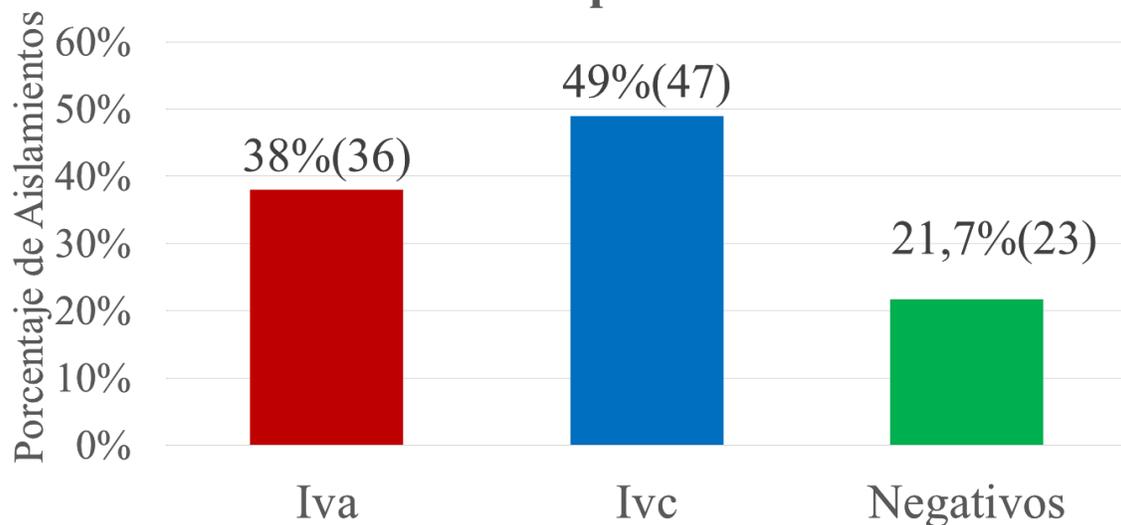
**Comparación de la presencia de B- Island en las dos técnicas de PCR** **IVa: 39**  
**IVc: 44**



**Figura 25. Comparación de la presencia de B-island en las dos técnicas de PCR. Que evalúan la amplificación de la bacteriocina (bsaB)**

De los aislamientos resistentes a meticilina, 36 (38%) presentaron un subtipo de *SCCmec* VIa, con características epidemiológicas similares al clon ST923. Por otro lado 47 (49%) aislamientos resistentes a meticilina presentaron un *SCCmec* VIc compatible epidemiológicamente con el clon USA300-VL, lo cual permitió dividir la población de estudio en tres grupos: Aislamientos resistentes con subtipo de *SCCmec* VIa, aislamientos resistentes con subtipo de *SCCmec* VIc y aislamientos sensibles a meticilina (Figura 26).

## Aislamientos identificados con la PCR Multiple



**Figura 26. Aislamientos identificados mediante la PCR múltiple.** Resultados de la PCR múltiple obtenidos aplicando el proceso de estandarización definido a los 106 aislamientos comprendidos en este estudio, el porcentaje de cada grupo de estudio fue calculado con el total de las muestras.

El comportamiento de los EGM en los aislamientos sensibles a metilina (SASM), mostraron poca relación con los elementos genéticos móviles evaluados durante el estudio, ya que su frecuencia no fue significativa con relación a las otras dos poblaciones de aislamientos; por lo que se decidió utilizarlos como validación de la estandarización de la PCR múltiple.

Fue calculado el índice Kappa de Cohen, utilizando el programa de Real Statistics para Excel 2013 (Disponible en línea <http://www.real-statistics.com/free-download/real-statistics-resource-pack/>), con el fin de ver el índice de concordancia de existente entre las técnicas convencionales de tipificación molecular (Información inicial suministrada por el LGMB en las bases de datos) y la PCR múltiple (Tabla 9). Se obtuvo un coeficiente de

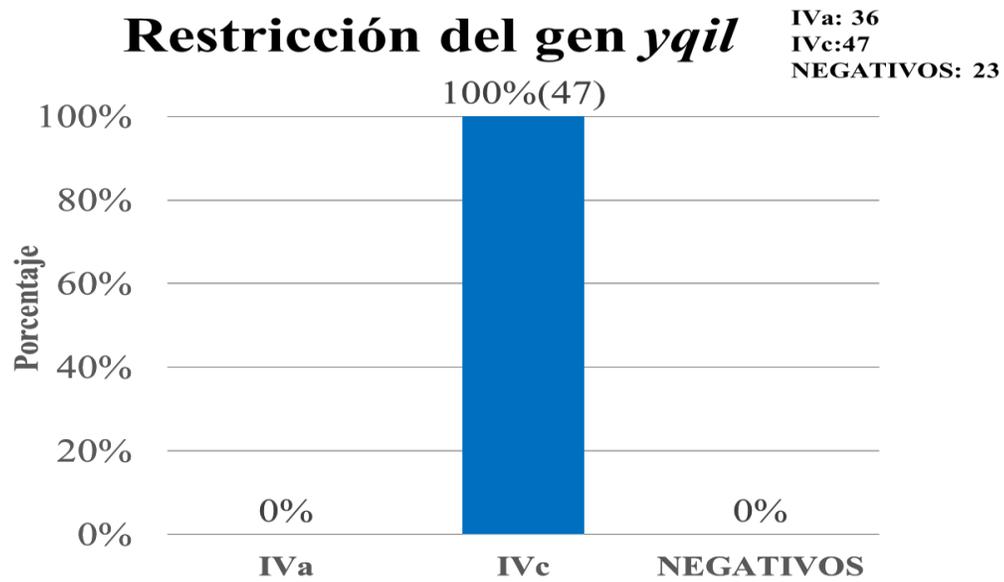
Kappa de 0.95, que según la literatura reporta se ubica en un rango de confiabilidad casi perfecta para expresar la concordancia entre dos observaciones (ANEXO 2).

<b>TECNICA</b>	<b>IVa</b>	<b>IVc</b>	<b>Negativos</b>	<b>TOTAL</b>	<b>Kappa de C.</b>
Convencionales	39	44	23	106	0.95
PCR Múltiple	36	47	23	106	

**Tabla 9.** Datos obtenidos de las técnicas convencionales de tipificación, PCR múltiple y el índice de kappa de Cohen para las tres poblaciones evaluadas.

### **7.5. Digestión del gen *yqiL*.**

La digestión del gen *yqiL* por la enzima *NedI* se obtuvo únicamente en los aislamientos resistentes a metilina asociados al clon USA300, con tipo de ST8 y subtipo de *SCCmec* IVc gracias a la presencia de una secuencia de reconocimiento específica (ca/tatg) de dicha enzima. Por ende se observó una digestión total del gen en los 47 aislamiento IVc equivalentes al 100% (Figura 27).



**Figura 27. Digestión del gen *yqiL* en los aislamientos estudiados.** Se obtuvo una digestión del gen en todos los aislamientos SARM de subtipo de SCCmec IVc. No se obtuvo restricción en ninguno de los demás grupos de estudio.

## 8. DISCUSIÓN.

La aparición, diseminación y establecimiento de clones de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina genotipo comunitario (CG-SARM) es una preocupación mundial debido a su mayor virulencia y su mayor capacidad de causar infecciones en personas sanas en comparación con los clones de SARM de genotipo hospitalario (HG-SARM) (43). El desarrollo genético de *S. aureus* ha contribuido a la emergencia y permanencia de este tipo de aislamientos; en varios países del mundo, estudios han descrito la circulación de estos clones hace más de dos décadas y su evolución del ámbito comunitario al hospitalario (54).

En 2005, Cruz, et al (10), evaluaron 200 muestras de SARM recolectadas entre 1996 y 2003 que provenían en su mayoría de hospitales de Bogotá y Cali (48 y 45 %, respectivamente) (10); los autores no detectaron el clon pediátrico, solo encontraron el denominado clon chileno. Este fue el primer reporte de tal clon en Colombia, lo cual, según los autores, indicaba un cambio en la población genética de SARM en el país. Álvarez, et al. (27), presentaron en el 2006 el primer reporte de SARM-GC en Colombia; posteriormente, Reyes, et al., en 2009 (12) y Álvarez, et al en 2010 (13) reportaron el clon USA 300 (el cual posee un tipo de secuencia ST8, un subtipo de *SCCmec* IVc, es PVL positiva y alberga los genes *sek*, *seq* y *bsaB* (8)) como causante de infecciones hospitalarias y Jiménez, et al., en 2012 (14) documentaron el predominio de cepas de SARM causantes de infecciones en hospitales de Medellín con una frecuencia entre el 85 y 90% (55).

En el año 2010, Escobar y colaboradores (8), reportaron la recuperación de 8 cepas de SARM- GC en cinco zonas geográficas del país, con características genéticas diferentes al clon reportado anteriormente, tales como: un subtipo de SCC*mec* IVa, un tipo de spa t16345 y un tipo de secuencia ST923 (una variante del locus único ST8) (51). En dicho estudio se confirmó la emergencia de un nuevo clon circulante en Colombia, el cual fue denominado como COL 923 (por el grupo a cargo de la investigación), a partir de estos datos se demostró que este clon emergente había sido causante de infecciones en pacientes pediátricos desde el año 2009, en otras ciudades además de Bogotá (8,56).

En el 2017, Escobar et al describieron a través de un estudio de secuencias comparativo entre los clones USA 300VL y COL923, la presencia de elementos genéticos móviles (EGM) con características estructurales que permitían una diferenciación entre dichos clones por medio de técnicas moleculares de identificación más complejas (8). En el presente estudio se estandarizó e implemento una PCR múltiple como herramienta molecular que permitió la amplificación de genes asociados a los EGM de la Isla de patogenicidad 5 de *Staphylococcus aureus* (SaPI5), Prografo 3 ( $\phi$ 3), Isla genómica beta y *yqiL*, con lo que se logró asociar genéticamente los aislamientos a cada uno de los clones de interés.

Actualmente, los aislamientos de SARM-GC se pueden diferenciar con mayor precisión utilizando técnicas robustas y costosas como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en ingles) y tipificación de multilocus de secuencias (MLST)(49,55) pero el desarrollo de estas técnicas se ha visto limitado en hospitales o instituciones que requieran de este tipo de herramientas. En Colombia y demás países en vías de desarrollo se

necesitan herramientas moleculares de identificación que sean de menor costo y de mayor manejo. Por ende el método estandarizado, permitió la identificación de los aislamientos en un periodo aproximado de 4 horas con 30 minutos, siendo este un tiempo óptimo y prudente a comparación de otras técnicas que requieren mayor tiempo como las ya mencionadas. Por esta razón consideramos que es de suma importancia el desarrollo de técnicas que permitan un rápido y óptimo reconocimiento de estos aislamientos ya que esto permite una orientación al personal autorizado en la toma de decisiones con respecto al tratamiento antibiótico adecuado para combatir las infecciones por este tipo de microorganismos; el no conocer las características genéticas de los mismos puede llevar a un tratamiento erróneo y a su vez contribuye a aumentar la resistencia a otras posibilidades terapéuticas.

La literatura reportada destaca que la frecuencia del clon USA 300VL, es de un 90% de los casos de infecciones descritos en población pediátrica y adulta; a comparación del clon COL923 que presenta una frecuencia menor del 10% (5, 11,18); a su vez el grupo para el control de la resistencia antimicrobiana de Bogotá (GREBO), ha descrito en sus boletines epidemiológicos, los diferentes reemplazos clonales que han acontecido en nuestro país y propone actualmente un nuevo recambio clonal por parte del nuevo clon emergente, el COL923 (18). Con nuestros resultados se logró identificar el 68% y el 32% de los aislamientos relacionados con el clon USA300 VL y COL923, respectivamente, lo cual refuerza la hipótesis planteada por el GREBO, y abre la posibilidad de realizar un seguimiento epidemiológico a este tipo de aislamientos al tener una herramienta de rápida identificación y menor costo.

Al realizar la amplificación individual de los EGM y compararla con la amplificación múltiple para la identificación y diferenciación de ambos clones, se logró calcular el índice de Kappa de Cohen dado un resultado de 0.95; el cual ubica nuestros resultados en un rango casi perfecto de concordancia (ANEXO 2).

Escobar en su artículo: “Design of two molecular methodologies for the rapid identification of Colombian community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates” en el año 2012, donde describe al gen *yqiL* como parte de un grupo de genes constitutivos de todas las cepas de *S. aureus*; útil para la clasificación de los tipos de ST's asociados a cada clon de diseminación mundial. En nuestro estudio, la digestión del gen *yqiL* con la enzima de restricción *NedI*, permitió establecer una marcada diferencia entre los aislamientos con tipo de ST923 (asociados al clon COL923) con los que poseen un tipo de ST8 (asociados al clon USA 300VL), presentándose una digestión del 100% en la totalidad de los aislamientos con esta característica (tipo de ST8), gracias a la presencia de una secuencia de reconocimiento de la enzima en este tipo de secuencias.

La digestión de este gen le otorga un aporte valioso a esta técnica al permitir confirmar la diferenciación e identificación de los aislamientos obtenida con la amplificación de los genes en la PCR.

Finalmente, se resalta la importancia de establecer un seguimiento epidemiológico a este tipo de aislamientos, ya que esta herramienta facilita una rápida detección de los mismos; esto es necesario teniendo en cuenta el comportamiento epidemiológico de los clones de *S. aureus* siendo este muy variante y se debe llevar un registro que permita establecer cuando

se esté pasando por otro cambio clonal, tomando las respectivas acciones cuando esto suceda.

## 9. CONCLUSIONES.

Es posible diferenciar los dos los principales clones de SARM.GC de circulación en Colombia (COL923 y USA30-VL) por medio de una herramienta molecular como la PCR múltiple, la cual permite identificar la presencia de cambios puntuales en elementos genéticos móviles que se encuentran altamente conservados en estos aislamientos.

Los cambios estructurales identificados en los elementos genéticos móviles como la isla de patogenicidad beta, SAPI5 y profago 3 son realmente específicos y conservados en los aislamientos de SARM-GC de circulación local lo cual permite su identificación y diferenciación.

Se evidencio que existe una buena correlación en los resultados obtenidos con la caracterización tradicional en la cual se realizan diferentes PCR de forma individual y la PCR múltiple permitiendo reducir considerablemente el costo y el tiempo de la clasificación de estos aislamientos, proporcionando información muy útil en el seguimiento epidemiológico de este patógeno.

## ANEXOS

### ANEXO 1. INFORMACION SUMINISTRADA POR LOS INSERTOS DE LOS INICIADORES

PRIMER	SECUENCIA	GEN	% G-C	TM
GP 193	5'-TTGGCAATTTTACGATAGCC-3'	<i>CcrB</i>	40%	51°C
GP 536	5'- ACCAGATAGTAAACACGAGCTA-3'		40,91%	58,4 °C
GP 530	5'- AAGAGATAAACGCCAAACCCT-3'	<i>Prophage 3 (923)</i>	42,86%	57,4°C
GP 531	5'- ACTGAGATGGTTGATTG-3'		36,36%	56,6°C
GP 429	5'- TAATCATGGCTCGCATTG-3'	<i>SAPI 5</i>	40%	51,3°C
GP 430	5'- GCGTTATCTGGCTTTGGTC-3'		50%	54,3°C
GP 433	5'- GAAGCACACCTAGCCAAAA-3'	<i>B- Island</i>	50%	55,5°C
GP 529	5'- TGCCAAAACATGCTAACACCAA-3'		40,91%	58,4°C
GP 532	5'- ACGGATTACTCGGCTTGCA-3'	<i>Prophage 3 (Vic)</i>	50%	58,4°C
GP 533	5'- TATGGGCGGTGCGATTAG- 3'		55%	60,5°C
GP 534	5'- CCTGCCAGAAACAGTACCTGC-3'	<i>yqil</i>	52,38%	61,3°C
GP 535	5'- ATCATCGCACCATCATTG-3'		47,62%	59,4°C

Tabla. Información detallada de cada uno de los iniciadores suministrada por el proveedor. La columna resaltada indica las temperaturas de anillamiento de cada uno de los iniciadores.

**ANEXO 2. VALORACIÓN DEL COEFICIENTE DE KAPPA (Landis y Koch, 1977)**

Coeficiente de Kappa	FUERZA DE CONCORDANCIA
0.00	Pobre
0,01-0,20	Leve
0,21-0,40	Aceptable
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Considerable
0,81-1,00	Casi perfecta

## REFERENCIAS

1. Luján Roca DA. Staphylococcus aureus resistente a meticilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares. An la Fac Med la Fac Med [Internet]. 2013;74(1):57–62. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/2053>
2. Cruz C, Castañeda E. Staphylococcus aureus , su éxito como patógeno y las implicaciones de la resistencia a los antimicrobianos. Médicas uis [Internet]. 2006;19:27–39. Disponible en: <http://revistas.uis.edu.co/index.php/revistamedicasuis/article/viewFile/2231/2590>
3. Malachowa N, Kobayashi SD, Sturdevant DE, Scott DP, DeLeo FR. Insights into the Staphylococcus aureus-host interface: Global changes in host and pathogen gene expression in a rabbit skin infection model. PLoS One. 2015;10(2):1–15.
4. Esparza-mantilla M. CARACTERIZACIÓN DE Staphylococcus aureus OBTENIDO DEL AMBIENTE HOSPITALARIO Y DEL PERSONAL DE SALUD EN UN CHARACTERIZATION OF Staphylococcus aureus OBTAINED FROM THE HOSPITAL ENVIRONMENT AND HEALTH CARE STAFF AT A HOSPITAL IN THE CITY OF CALI. 2017;16(2):22–33.
5. Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogota. Análisis de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2013. Componente pediátrico y adulto. Bol Inf GREBO [Internet]. 2014;(6):40. Disponible en: [http://www.grebo.org/documentos/Boletin\\_Grebo\\_2014.pdf](http://www.grebo.org/documentos/Boletin_Grebo_2014.pdf)
6. Carmen BO. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de Staphylococcus aureus aisladas en hospitales españoles. Bienio. Universidad de Bcelona; 2006.
7. Ricardo-caldera DM, Buelvas-doria FA, Escobar-pérez JA, Tovar-acero C. Colonización y factores de virulencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en una población infantil de Montería. IATREIA. 2015;28(3):259–68.
8. Escobar-Perez J, Reyes N, Marquez-Ortiz RA, Rebollo J, Pinzón H, Tovar C, et al. Emergence and spread of a new community-genotype methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone in Colombia. BMC Infect Dis [Internet]. 2017;17(1):108. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28143440><http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2193-3>
9. Zendejas-manzo GS, Avalos-flores H, Soto-padilla MY. Microbiología general de Staphylococcus aureus : Generalidades , patogenicidad y métodos de identificación. 2014;25(3):129–43.
10. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del Staphylococcus aureus. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab [Internet].

2014;61(1):28–40. Disponible en:  
www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx

11. Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogota. Resultados del Proyecto: “Impacto Clínico y Económico de la Resistencia Bacteriana en hospitales del Distrito”. Bol Inf GREBO. 2010;1–28.
12. Review ADER. Interacciones farmacológicas relacionadas con la administración de antibióticos betalactámicos. 2016;73(5):227–34.
13. Sopena N, Sabri M. Staphylococcus aureus resistente a la meticilina. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002;118(17):671–6.
14. García-vázquez E, Hernández-torres A, Medicina S De, Clínico IH, Virgen U, Arriaxaca D. Los betalactámicos en la práctica clínica. Rev española Quimioter. 2015;28(1):1–9.
15. Rice LB. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to  $\beta$ -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. JMCP [Internet]. 2012;87(2):198–208. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.003>
16. Marín M. Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecc Microbiol Clin. 2003;21(1):42–55.
17. Suarez C. Antibioticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(2):116–29.
18. Camarena JJ, Microbiología D De, Universitario H, Peset D. INFECCIÓN POR Staphylococcus aureus RESISTENTE A METICILINA. Control Calid SEIMC. 1997;
19. González C, Maribel J, Armindo J, General DB, Bioanálisis E De. Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en Staphylococcus aureus Mechanisms of Resistance To  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Staphylococcus aureus. kasmara. 2010;38(1):18–35.
20. Luis J, Ángel J. Detección de mecanismos de resistencia. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21:72–4.
21. Chávez M, Erazo NC, Reina DA, Esparza M. Métodos de tipificación y epidemiología molecular de Staphylococcus aureus con resistencia a la meticilina. Biosalud [Internet]. 2015;14(2):81–90. Disponible en: [http://200.21.104.25/biosalud/downloads/Biosalud14\(2\)\\_8.pdf](http://200.21.104.25/biosalud/downloads/Biosalud14(2)_8.pdf)
22. Bustos-Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M. Staphylococcus aureus : la reemergencia de un patógeno. Rev biomed. 2006;17(4):287–305.
23. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus carrying panton-

- valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(8):978–84.
24. Ma J. Tipo de cas set te cro mo só mi co es ta fi lo có ci co en ce pas clí ni cas de Staphylo coccus au reus re sis ten tes a me ti ci li na Staphylococcal Chromosomal Cassette Type in Clinical Strains of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. 2014;42(2):116–30.
  25. Cervantes-garcía E, García-gonzález R, Salazar-schettino PM. Importancia de Staphylococcus aureus meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab.* 2014;61(4):196–204.
  26. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K. Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(5):1323–36.
  27. Ito T, Kuwahara-arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, et al. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC mec ) Analysis of MRSA. *Springer Sci Media.* 2014;1085:131–48.
  28. Francis Alonzo III VJT. A Lesson in Survival: S. aureus versus the Skin. *Cell Host Microbe.* 2013;3–5.
  29. St-mrsa-iv G, Shore AC, Rossney AS, Brennan OM, Kinnevey PM, Humphreys H, et al. Characterization of a Novel Arginine Catabolic Mobile Element ( ACME ) and Staphylococcal Chromosomal Cassette mec Composite Island with Significant Homology to Staphylococcus epidermidis ACME Type II in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):1896–905.
  30. Quiceno JNJ, Ochoa MMC. Staphylococcus aureus resistente a meticilina : bases moleculares de la resistencia , epidemiología y tipificación. *LATREIA.* 2009;22:147–58.
  31. Deurenberg RH, Nieuwenhuis RF, Driessen C, London N, Stassen FR, Tiel FH Van, et al. The prevalence of the Staphylococcus aureus tst gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener Ö s Granulomatosis patients. *FEMS Microbiol Lett.* 2017;245(September):185–9.
  32. Pinchuk I V, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal Enterotoxins. *MDPI Toxins.* 2010;2:2177–97.
  33. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect.* 2001;3:585–94.
  34. Papageorgiou AC, Tranter HS, Acharya KR. Crystal Structure of Microbial Superantigen Ê Resolution : Staphylococcal Enterotoxin B at 1 . 5 Å Implications for Superantigen Recognition by MHC Class II Molecules and T-cell Receptors. *JMB.* 1998;61–79.

35. Chiang Y, Liao W, Fan C, Pai W. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins ( SEs ) N , O , P , Q , R , U , and survey of SE types in Staphylococcus aureus isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int J Food Microbiol.* 2008;121:66–73.
36. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. *MDPI Toxins.* 2010;1751–73.
37. D.-L. Hu, H.K. Ono, S. Isayama , R. Okada , M. Okamura , L.C. Lei, Z.S. Liu, X.-C. Zhang, M.Y. Liu , J.C. Cui AN. Biological characteristics of staphylococcal enterotoxin Q and its potential risk for food poisoning. *J Appl Microbiol.* 2017;1672–9.
38. Orwin PM, Leung DYM, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. *Am Soc Microbiol Infect INMUNITY.* 2001;69(1):360–6.
39. Jodi A. Lindsay . Matthew T. G. Holden. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of Staphylococcus aureus. *Funct Integr Genomics.* 2006;6:186–201.
40. Olarte NM, Valderrama IA, Reyes KR, Garzón MI, Escobar JA, Castro BE, et al. Colonización por Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en una unidad de cuidados intensivos de adultos de un hospital colombiano : caracterización fenotípica y molecular con detección de un clon de circulación en la comunidad. *Biomédica.* 2010;182(3):353–61.
41. María Ángeles Domínguez Luzóna y Miquel Pujol Rojo. Cambios en la epidemiología de. *Control Calid SEIMC [Internet].* 1991; Disponible en: [www.seimc.org](http://www.seimc.org)
42. Usa MS, Arias C a, Sc M, D P, Universitario H. NIH Public Access. *English J.* 2009;359(20):2177–9.
43. Machuca MA, Sosa LM, González CI. Molecular Typing and Virulence Characteristic of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Isolates from Pediatric Patients in Bucaramanga, Colombia. *PLoS One.* 2013;8(8).
44. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):616–87.
45. Chaves F. Emergencia de infecciones peditricas por Staphylococcus aureus resistente a meticilina asociadas a la comunidad: ??debemos dar la alerta? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(10):672–4.
46. Acuña M, Benadof D, Jadue C, Hormazábal JC, Alarcón P, Contreras J, et al. Staphylococcus aureus resistente a meticilina asociado a la comunidad (SARM-AC): comunicación de los primeros cuatro casos pediátricos descritos en Hospital de Niños Roberto del Río. *Rev Chil infectología.* 2015;32(3):350–6.

47. Ocampo AM, Vélez L a, Robledo J, Jiménez JN. Cambios a lo largo del tiempo en la distribución de los complejos de clones dominantes de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en Medellín , Colombia. *Biomédica*. 2014;34(Supl 1):34–40.
48. Rincón S, Panesso D, Díaz L, Carvajal LP, Reyes J, Munita JM, et al. [Resistance to &quot;last resort&quot; antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin era]. *Biomedica*. 2014;34 Suppl 1(0 1):191–208.
49. Escobar-Perez J a, Castro BE, Marquez-Ortiz R a, Gaines S, Chavarro B, Moreno J, et al. Aislamientos de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina relacionados genéticamente con el clon USA300, ¿origen de los aislamientos SARM de genotipo comunitario en Colombia? *Biomedica*. 2014;34(3):124–36.
50. Alvarez CA, Yomayusa N, Leal AL, Moreno J, Mendez-Alvarez S, Ibañez M, et al. Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia. *Am J Infect Control*. 2010;38(4):315–8.
51. Jiménez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodríguez EA, Mediavilla JR, Chen L, et al. CC8 MRSA strains harboring SCCmec type IVc are predominant in Colombian hospitals. *PLoS One*. 2012;7(6):1–10.
52. Escobar JA, Marquez-Ortiz RA, Alvarez-Olmos MI, Leal AL, Castro BE, Vanegas N. Detection of a new community genotype methicillin-resistant staphylococcus aureus clone that is unrelated to the USA300 clone and that causes pediatric infections in colombia. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):661–4.
53. Leal Ana Lucía, Álvarez Carlos Arturo, Cortes Jorge Alberto OMV. Co-producciones de carbapenemasas un fenómeno en aumento y de difícil detección en el laboratorio de microbiología con pruebas fenotípicas [Internet]. 2016. Disponible en: [http://www.grebo.org/grebo\\_site/jgrebo/documentos/Boletin\\_Informativo\\_2015\\_2016.pdf](http://www.grebo.org/grebo_site/jgrebo/documentos/Boletin_Informativo_2015_2016.pdf)
54. Escobar JA, Gómez IT, Murillo MJ, Castro BE, Chavarro B, Márquez RA, et al. Design of two molecular methodologies for the rapid identification of Colombian community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Biomedica* [Internet]. 2012;32(2):214–23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242295>
55. Rodríguez EA, Correa MM, Ospina S, Atehortúa SL, Jiménez JN. Differences in epidemiological and molecular characteristics of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* (MSSA-MRSA) in children from a university hospital and day care centers. *PLoS One*. 2014;9(7).
56. Planet PJ, Diaz L, Kolokotronis SO, Narechania A, Reyes J, Xing G, et al. Parallel epidemics of community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus USA300 infection in North and South America. *J Infect Dis*. 2015;212(12):1874–82.