



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Staphylococcus*  
METICILINO RESISTENTES AISLADAS EN EL LABORATORIO DE  
BACTERIOLOGÍA DEL SERVICIO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO  
“Antonio Patricio de Alcalá” DE CUMANÁ  
(Modalidad: Investigación)

SARAI DEL VALLE ACUÑA RAMÍREZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2008

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Staphylococcus*  
METICILINO RESISTENTES AISLADAS EN EL LABORATORIO DE  
BACTERIOLOGÍA DEL SERVICIO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO  
“Antonio Patricio de Alcalá” DE CUMANÁ

APROBADO POR:

---

Dra. Lorena Abadía Patiño

Asesora

---

---

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	iii
LISTA DE TABLAS .....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	10
Recolección de cepas .....	10
Preparación del inóculo bacteriano .....	10
Realización de los antibiogramas.....	11
Extracción de ADN.....	11
Verificación de la extracción del ADN.....	12
Identificación molecular del SCCmec en cepas SMR: .....	13
Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias .....	14
Detección de la producción de betalactamasas .....	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN .....	23
CONCLUSIONES .....	40
RECOMENDACIONES .....	41
BIBLIOGRAFÍA .....	42

## DEDICATORIA

Ante todo le dedico este trabajo a Dios y a mi madrina espiritual Nuestra Señora Del Valle, quienes siempre han estado allí conmigo en los momentos más difíciles y en los felices; por enseñarme que el tiempo es perfecto y todas las situaciones ocurren por algún motivo.

A mis padres Luisa Zoraida Ramírez de Acuña y Franz José Acuña Hernández, quienes con sacrificio y dedicación han ayudado a lograr materializar unos de mis grandes sueños, me enseñaron sencillez, dedicación y como alcanzar el éxito, con tan solo una señal de humo siempre estuvieron con ayuda incondicional. Gracias por comprender mi carrera y apoyarme al máximo.

A mi gran amor, la ilusión de la casa, y a la vez el tormento Miguel Adolfo Acuña Ramírez (Miguelito); por acompañarme a estudiar, por recordarme el niño que todos llevamos por dentro, por sus discusiones y sus curiosidades. Te lo dedico a ti Miguel para que me superes y logres cuanto desees.

Una persona que me ayudó a defenderme en la vida quién me ha acompañado desde que nací y aunque siempre hemos sido los polos opuestos, me enseñó a competir, a compartir y en gran parte a vivir... Indira del Valle Acuña Ramírez.

A quién ha logrado tener un lugar mucho más grande que el de una abuela en mi corazón la señora Hilda Carrión.

Hay quienes nos acompañan y ayudan no solo en el trabajo de grado, que aunque es difícil y es la parte que más nos cuesta de la carrera, es necesario dedicarle

una parte a quienes han estado con nosotros en la carrera, quienes han sido nuestra vía de escape, los culpables de trasnochos, de bajas notas y de apoyo. Esta parte se la dedico a Julio Delfín García Jordan, por obligarme a entrar a clases y ayudarme a encontrar sin querer la carrera perfecta y a Nelson Javier Marcano Galantón, por su compañía, consejos, apoyo y amor.

Más allá de los amores, existen unas personas que comparten durante toda la estadía universitaria, o buena parte de ella, porque nos distanciamos en las tesis. Hubo un grupo, el denominado por un querido profesor como “el grupo feliz”; Carolina Camino (Shaki), Gabriela Uzcátegui, Carlos Rabascall, Ángel Marval, Carolina Laurent y mi compañero de siempre Michael Rodríguez, les dedico este trabajo porque también es de ustedes por su compañía, alegría, lágrimas, salidas, discusiones... tantas cosas, ya Gaby terminó, espero que todos logremos concretar nuestros sueños.

A los amigos de siempre, esos amigos especiales, incondicionales, los de la mejor época; el bachillerato: María Nohemí Ferraioli Barrios (momi), Natasha Mercedes Marval Fernández, Javier Santos, Rosnuel López, Pilar de Lourdes López Quijada, un besote!!!

## **AGRADECIMIENTOS**

El momento de agradecer a todas aquellas personas que nos ayudaron a concretar el trabajo de grado, el que haya estado a mi lado sabe todo lo que viví.

Antes que nada, a alguien que conocí hace 3 años, que me ha enseñado conocimientos, responsabilidad, respeto, la oportunidad de aprender técnicas que en el departamento no contamos, además de su sentir humano, esa amiga que a veces no está en el lugar de trabajo, yo si la tuve, mi principal agradecimiento es a la Dra. Lorena Abadía Patiño, muchísimas gracias por todo!!! Ha sido un honor trabajar a su lado.

Al personal del Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA, en especial a la Licenciada María Marcano.

En el Postgrado de Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, a los profesores Aracelys Arcía, Mariolga Berrizbeitia, José Antonio Maldonado, Jesús Bastardo y en especial al Laboratorio de Microbiología a las profesoras Luz Betina Villalobos y Rosa Martínez, a Luz y a Luis Enrique, disculpen las molestias.

A la Sociedad Venezolana de Infectología.

A la profesora Tahís Pico de Olivero, gracias a su oportuna ayuda pude empezar mi muestreo.

A las personas que laboran en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología, en especial a la profesora Bethsy Cedeño y al Laboratorio de Genética Molecular del IIBCA, dirigido por el Dr. Marcos de Donato.

En general a las personas que trabajan en el Departamento de Biología, que de verdad ha sido como mi segundo hogar y en especial a los profesores: Ángel Fariña, Norys Jordan, Oscar Leonardo Chinchilla, José Véliz, Isabel Mimbela, Aracelys Torres, Julio Armas, Mairin Lemus, Yelitza Mago, Ysabel Campos, Rosa Martínez, Sinatra Salazar, y a Gladys (sabe que ha sido como mi segunda madre), Frankis, Gabriela, Heidy y Carlos.

A quienes ayudaron quizás más que indirectamente Eliosmar Rodríguez (un millón de gracias), Fred Cañas, Nelson Antonio Marcano, Ysabel Lara, Wilnora Rojas y Andreina Fede.

A mis compañeras de laboratorio, quienes sufrieron y gozaron con mis “hijas”; Yamilet Boada, Matilde Torrens y Annie Tineo.

A las técnicas del Departamento de Química Roseline Zavala y Liliana Andrade y del IIBCA en especial Milagros Moreno y Antonio Gómez.

Mil gracias a mis amigos: Zulay Castillo, Karla Rincones, Zhorymar Zambrano, Inaydes Salazar, Barkev Koftayan, Adrián Márquez, Lena Castillo, Juan Manuel Ramírez, Julio Castañeda, Norys García, a mis panas de la 24, que momentos los vividos en la Universidad de Oriente!!!

A todas aquellas personas que colaboraron en este trabajo.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Procedencia de las cepas <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidas durante los meses de enero a julio 2007 en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA. ....	16
Tabla 2. Tipos de muestras de las cepas <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidas durante los meses de enero a julio de 2007 en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA..	17
Tabla 3. Procedencia de las cepas <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa obtenidas durante los meses de enero a julio 2007 en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.....	17
Tabla 4. Tipos de muestras de <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa obtenidas durante los meses de enero a julio de 2007 en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA. ....	18
Tabla 5. Antibiotipos de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.....	19
Tabla 6. Antibiotipo de las cepas de <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.....	19
Tabla 7. Fenotipo, genotipo, tipo de SCCmec y CMI en cepas <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA (enero a julio 2007).....	22
Tabla 8. Fenotipo, genotipo, tipo de SCCmec y CMI en cepas <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA (enero a julio 2007). ....	23
Tabla 9. Loci amplificados en la PCR múltiple en las cepas <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA. ....	25
Tabla 10. Loci amplificados en la PCR múltiple en las cepas <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA. ....	26



## RESUMEN

Para la caracterización molecular de las cepas de *Staphylococcus* meticilino resistente (SMR), se colectaron 59 cepas SMR aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA, en un período de siete meses (enero a julio 2007). Se obtuvieron 50 cepas resistentes a meticilina, sin duplicado, 21 *S. aureus* y 29 *Staphylococcus* coagulasa positiva (SCN). Se les realizó perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos, PCR múltiple, a las cepas positivas para *mecA*, se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). *S. aureus* reportó 20 cepas resistentes a oxacilina y cefoxitina y 27 cepas de SCN resistentes a oxacilina y a cefoxitina, correlacionándose la presencia del gen *mecA* con el número de cepas resistentes a oxacilina y a cefoxitina solo en *S. aureus*; algunas discordancias fueron observadas en cepas de SCN, presentó una cepa sensible a oxacilina y cefoxitina, con *mecA* positivo y 7 cepas que reportaban resistencia a meticilina pero con ausencia del gen *mecA*. En el caso de las cepas de *Staphylococcus* que fueron resistentes a meticilina, pero sin gen *mecA*, resultaron ser cepas hiperproductoras de betalactamasas o con PBP constitutivas mutadas. Las cepas de *Staphylococcus* presentaron multiresistencia a eritromicina, clindamicina y susceptibilidad intermedia a teicoplanina y vancomicina y una cepa de *S. aureus* resultó resistentes a vancomicina. La mayoría de *Staphylococcus* se ubicaron como SCC*mec* tipo I y IV, siendo el primero el clon arcaico y el IV el clon comunitario, sin embargo, en pocos casos de *S. aureus* y en la mayoría de los SCN no se logró determinar, necesitándose otros oligonucleótidos para determinar los subtipos de los SCC*mec*. Las cepas que presentaron gen *mecA*, para la CMI a oxacilina, las cepas 1-8, 11, 13 y 17 de *S. aureus* y las 5, 10, 11, 16, 18, 27 y 28 se ubicaron en clase 4 con hiperresistencia; las cepas 9, 14, 15, 16, 18, 19 y 20 de *S. aureus* y 4, 9 y 19 SCN se ubicaron en clase 3 con heteroresistencia con altos niveles de resistencia; las cepas 3, 15 y 29 de SCN en clase 2 heteroresistentes; mientras que la 21 de *S. aureus* y las 1, 3, 6, 7, 14, 20, 22, 24 y 26 en clase 1 heteroresistentes pero con bajo niveles de resistencia. Las penicilinas resistentes a penicilinasas siguen siendo la primera opción terapéutica en las infecciones ocasionadas por *Staphylococcus* en los diferentes servicios del SAHUAPA, porque el porcentaje de cepas SMR no fue tan elevado.

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus* es un coco Gram positivo, de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, aislado, en parejas o tetradas y se divide en más de un plano para formar racimos irregulares. La pared celular contiene peptidoglicano y ácidos teicoicos; es anaerobio facultativo y habitualmente catalasa positivo (Prescott *et al.*, 2002).

*Staphylococcus* figura entre las bacterias patógenas más importantes para el ser humano. Es habitante normal de las vías respiratorias superiores, piel, intestino y vagina. Junto con neumococos y estreptococos, son miembros de un grupo de bacterias Gram positivas invasoras conocidas como cocos piógenos o productores de pus (Prescott *et al.*, 2002).

Existen cepas patógenas y no patógenas; esta diferencia se basa en la síntesis de la enzima coagulasa. *Staphylococcus aureus*, el principal representante de cepas coagulasa-positivas, denominado a menudo estafilococo dorado, causa graves infecciones crónicas. Entre otros coagulasa positivos no relacionados con patogenicidad se encuentran *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* (Madigan *et al.*, 2004).

Los estafilococos coagulasa negativo (SCN) no producen coagulasa, carecen de pigmento y en general son menos invasores, pero, actualmente, se les relaciona con más frecuencia, como patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos con graves infecciones nosocomiales (Carmona, 1997).

Entre los SCN se encuentran: *S. capitis*, *S. caprae*, *S. warneri*, *S. caseolyticus*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus*, *S. lugdunensis*, *S.*

*epidermidis*, *S. muscae*, *S. auricularis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. kloosii*, *S. equorum*, *S. arlettae*, *S. gallinarum*, *S. simulans*, *S. lentus*, *S. carnosus*, *S. piscifermentanus*, *S. felis*, *S. chromogenes* y *S. vitulus* (Madigan *et al.*, 2004).

El *Staphylococcus* presente en portadores asintomáticos o enfermos, se propaga a través de las manos, es expelido por el aparato respiratorio, o transportado por objetos animados o inanimados, causando enfermedad en cualquier órgano o tejido del cuerpo. Sin embargo, debe hacerse hincapié en que las infecciones estafilocócicas, en su mayor parte, ocurren en personas cuyos mecanismos de defensa están comprometidos, como los que ingresan en un hospital (Carmona, 1997).

*S. aureus* es responsable de un gran número de infecciones en humanos como septicemia, endocarditis y neumonía. Esta bacteria produce una diversidad de procesos clínicos, siendo la lesión característica el absceso piógeno o exudado purulento. Además, las toxinas extracelulares en ciertas circunstancias dominan este cuadro clínico (intoxicación alimentaria y síndrome de choque tóxico, entre otros). Cualquier infección localizada puede convertirse en el punto de siembra de una bacteriemia potencialmente fatal (De la Parte-Pérez *et al.*, 2003).

En 1941, las infecciones estafilocócicas eran erradicadas con penicilina, pero poco después de su introducción, se reportó el aislamiento de una cepa resistente por producción de betalactamasas (Spink, 1945). Dos décadas más tarde 60% de las cepas intrahospitalarias eran resistentes a penicilina (Hartman y Tomasz, 1984).

La introducción en la terapéutica de otros antiestafilocócicos como sulfamidas, estreptomicina, tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina fue seguida de la aparición de cepas *S. aureus* resistentes a estos fármacos, además de la penicilina. Este patrón

de resistencia era frecuente en los hospitales a finales de los años 50, lo que dificultó de nuevo el tratamiento de las infecciones estafilocócicas (Brumfitt, 1989).

En 1959 apareció la meticilina, una penicilina semisintética, utilizada en el tratamiento clínico de *S. aureus* hasta que fueron reportadas las primeras cepas resistentes a meticilina (Jevons, 1961). *S. aureus* meticilino resistente (SAMR) es resistente a todos los betalactámicos, creando un problema clínico importante porque existen pocas opciones terapéuticas (Mongkolrattanothai *et al.*, 2004).

Las proteínas de unión a las penicilinas (PBP), un grupo de enzimas que catalizan las reacciones terminales en la biosíntesis del péptidoglicano, son el blanco de acción de los betalactámicos. En *Staphylococcus* se encuentran 4 tipos de PBP que van de la PBP1 a la PBP4. La transpeptidación y carboxipeptidación son inhibidas cuando estas proteínas son aciladas por un antibiótico betalactámico, el anillo betalactámico se abre y forma un enlace covalente con un sitio activo a través de un residuo de serina en la PBP (Pucci y Dougherty, 2002). Se han descrito tres mecanismos que explican la resistencia de *S. aureus* a betalactámicos: hiperproducción de betalactamasa, modificación de las PBP y resistencia intrínseca a meticilina (Gil, 2000).

La hiperproducción de betalactamasa se caracteriza por una producción excesiva de penicilinas estafilocócica normal, la cual es mediada por plásmidos, lo que hace que oxacilina y meticilina, que fueron desarrolladas para resistir la acción hidrolítica de la penicilinas, sea lenta aunque apreciablemente degradada. Este fenotipo se conoce como BORSA, por tener concentración mínima inhibitoria en los límites de las cepas sensibles, conocidas como cepas Borderline (Tomasz *et al.*, 1989).

La modificación de las PBP corresponde a una modificación mínima de las PBP

1, 2 y 4, de peso molecular normal pero con baja afinidad a los betalactámicos. Este fenotipo que se conoce como MODSA viene dado por las modificaciones de las PBP debido a mutaciones puntuales (Tomasz *et al.*, 1989).

La resistencia intrínseca a meticilina en *S. aureus* depende de una proteína específica de membrana denominada PBP2a o PBP2', la cual tiene afinidad reducida por los betalactámicos y es diferente a la PBP2 (Hartman y Tomasz, 1984). Dicha resistencia está codificada por el gen *mecA*. Otros géneros pueden desarrollar resistencia a betalactámicos, pero solo *Staphylococcus* presenta el gen *mecA*, el cual le concede este tipo de resistencia (Katayama *et al.*, 2003).

El gen *mecA* está ubicado en un elemento exógeno de ADN, el cual está insertado en el cromosoma de *S. aureus* (Katayama *et al.*, 2003), está regulado por dos genes, *mecRI* y *mecI*, localizados por delante del gen *mecA* (downstream) y este conjunto de genes ha sido referido como complejo *mec* (Lim *et al.*, 2002).

El complejo cromosómico de *Staphylococcus* (SCC) es un elemento genético móvil que transporta el complejo *mec*, constituido por los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI*, además del complejo *ccr*, formado por los genes *ccrA* y *ccrB* (SCC*mec*). Han sido descritos seis tipos de SCC*mec* (Ito *et al.*, 1999; 2001; Oliveira *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002), del I al VI, de acuerdo al complejo *mec* y del complejo *ccr* presente (Mongkolrattanothai *et al.*, 2004). El SCC*mec* tipo I corresponde al complejo *mecA* clase B y al complejo *ccr* tipo 1; el SCC*mec* tipo II complejo *mec* clase A y al complejo *ccr* tipo 2; el SCC*mec* tipo III al complejo *mec* clase A y al complejo *ccr* tipo 3; el SCC*mec* tipo IV al complejo *mec* clase B y al complejo *ccr* tipo 2; el tipo SCC*mec* tipo V correspondiente al complejo *mec* clase C2, y al complejo *ccr* tipo 5, que en lugar de tener los genes *ccrA* y *ccrB* lleva una copia de un gen homólogo, *ccrC* (Ito *et al.*, 2004) y, por último, el tipo VI el cual es similar al tipo IV pero con un nuevo tipo *ccrAB* (Oliveira *et al.*, 2006).

Algunos autores asumen que los genes *ccr* y *mec* provienen de *Staphylococcus* coagulasa negativos de origen desconocido, en quienes ocurrió una delección en los genes reguladores de *mec*, antes de ser transferidos a *S. aureus*, generando cepas *Staphylococcus* resistentes a meticilina (Suzuki *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996; Hiramatsu *et al.*, 2001).

El mecanismo responsable de la transferencia de *mecA* se desconoce, pero existen evidencias que suponen una transferencia horizontal entre especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos no descritos y *S. aureus* (Hanssen *et al.*, 2004).

Un medio por el cual las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos es por la transferencia horizontal de genes resistentes a los antibióticos. Esta transferencia de genes de resistencia es frecuente y se demuestra en muchos casos de resistencia bacteriana (Anderson, 2005).

La expresión fenotípica de la resistencia a la meticilina se clasifica en heteroresistencia y homoresistencia; la primera se refiere a una población, donde solo un pequeño porcentaje de cepas expresan la resistencia. La heteroresistencia comprende tres clases (1-3). La homoresistencia implica que todas las células de esa población expresan la resistencia y se denomina clase 4, la concentración mínima inhibitoria (CMI) puede ir de 400 a 1 000 mg/l (Tomasz *et al.*, 1991). La heteroresistencia más heterogénea es la clase 1 y la más homogénea es la clase 3. La clase 1 tiene un rango de CMI de 1,5 a 3 mg/l a oxacilina con una subpoblación de  $10^{-8}$  células. La CMI de la clase 2 va de 6 a 12 mg/l, con una subpoblación de  $10^{-5}$ . La CMI de la clase 3 está entre 50 y 200 mg/l, con una subpoblación de  $10^{-3}$  (Tomasz *et al.*, 1991).

El uso de técnicas moleculares ha ido incrementándose con frecuencia en estudios epidemiológicos de *Staphylococcus* metilino resistentes (SMR) para un

mayor conocimiento de la evolución y la relación de dichos clones. La primera detección de la meticilino resistencia es a través del antibiograma, la cual es una prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, que aunque no es una técnica molecular, es primordial para detectar este tipo de resistencia en los Laboratorios de Bacteriología a nivel clínico; luego se realizan técnicas más avanzadas, tales como tipificación de secuencia *multilocus* (MLST) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simple (Oliveira *et al.*, 2001, Oliveira y de Lencastre, 2002). Sin embargo, estos métodos son laboriosos y consumen tiempo y dinero. En este sentido, se ha desarrollado otra técnica conocida como PCR múltiple, la cual es utilizada para detectar las variaciones estructurales observadas en el elemento *SCCmec*, este método provee una herramienta para la rápida identificación de la estructura del elemento *SCCmec*. La PCR múltiple es una técnica que demuestra ser rápida, veraz y permite, en un ensayo único, la identificación de cepas SMR y de cinco tipos de estructuras del elemento *mec*, identificando los cuatro principales con dos variaciones menores, caracterizando así los SMR (Oliveira y de Lencastre, 2002).

La PCR múltiple incluye el estudio de ocho *loci*, y un control interno para el gen *mecA*. El *locus A* se encuentra en la región baja del gen *pls* y es específico para *SCCmec* tipo I; el *locus B* es interno del operón *kdp*, el cual es específico para *SCCmec* tipo II; *locus C* es interno en el gen *mecI* presente en los *SCCmec* tipo II y III; *locus D* interno en la región *dcs*, presente en los *SCCmec* I, II y IV; *locus E* está localizado entre la región integrada por el plásmido pI258 y el transposón Tn554, específico para *SCCmec* tipo III; *locus F*, el cual también es específico para *SCCmec* tipo III, está se ubica entre Tn554 y el gen *orfX*. Los *loci G* y *H* se han incluido para distinguir las variantes IA y IIIA (Oliveira y de Lencastre, 2002).

La caracterización molecular de cepas *Staphylococcus* meticilino resistente (SMR) es necesaria para conocer que tipo de *SCCmec* se tiene en una región y con esta información predecir qué antibiótico suministrar en infecciones graves. Si existe

resistencia a metilina, no se puede tratar con betalactámicos y se deben buscar otras opciones terapéuticas (Oliveira y de Lencastre, 2002).

En Venezuela se han realizado estudios en cepas SAMR para un control epidemiológico, en especial en pacientes que se encuentran en unidades de cuidados intensivos (UCI), ya sea de adulto o neonatal. El principal interés de estos estudios ha sido dirigido hacia los portadores nasales de estas cepas, entre los cuales, generalmente, está involucrado el personal hospitalario (Requena *et al.*, 2005; Tedesco *et al.*, 2005).

En la Escuela de Ciencias de la Salud “Francisco Battistini”, del Núcleo de Bolívar de la Universidad de Oriente, se demostró una frecuencia en portadores nasales de cepas *S. aureus* de 32 a 34%, predominando el personal de salud (Tedesco *et al.*, 2005). Se aislaron cepas SAMR, casi un 70%, con alta susceptibilidad a rifampicina y vancomicina. Estos últimos datos indican que existen otras opciones terapéuticas que no sean betalactámicos. Sin embargo, otros estudios nacionales demuestran que existen 10% de cepas SAMR resistentes a linezolid, provenientes de UCI y 5,9%, en pacientes hospitalizados en otros servicios (Vivas *et al.*, 2005); estos datos llaman la atención por ser éste un antibiótico de reciente introducción al mercado farmacológico, el cual representa una alternativa terapéutica contra cepas SAMR multirresistentes y a nivel mundial no se han reportado cepas con este porcentaje tan elevado de resistencia a linezolid, estas cepas deben estudiarse en un laboratorio de referencia para su confirmación.

En los últimos años ha aumentando el estudio en *Staphylococcus* cuagulasa negativa (SCN), microorganismos importantes debido a la cantidad de bacteriemias producidas en neonatos, pacientes en UCI e inmunocomprometidos. Sin embargo, son pocos los trabajos realizados en Venezuela. Al respecto, en la Unidad de alto riesgo neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA),



Mérida, se caracterizaron fenotípicamente SCN, aislando 48% de las muestras analizadas, de los cuales, 78% provenían de neonatos con bacteriemia, siendo *S. epidermidis* y *S. warneri*, las principales especies; la caracterización fenotípica fue la siguiente: 100% de resistencia a penicilina, 69% a oxacilina y 78% a gentamicina, 100% sensibilidad a vancomicina y a quinupristina-dalfopristina. Aunque estas cepas en individuos sanos no causan daño, porque el mismo sistema inmunitario los ataca, en pacientes inmunosuprimidos hay que tomar medidas de asepsia para evitar posibles infecciones debido a la colonización (Álvarez *et al.*, 2005).

La terapia con vancomicina es una alternativa viable para los pacientes con SARM, aunque en los últimos años se han reportado cepas *Staphylococcus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA); la vancomicina es un antibiótico de los grupos glicopéptidos que tienen como blanco principal las subunidades D-Ala-D-Ala en los monómeros del peptidoglicano de las bacterias Gram positivas, que sirven como precursores de la síntesis de la pared celular. La resistencia en las cepas VISA no está mediada por un mecanismo único, sino que parece involucrar una compleja reorganización de la síntesis de la pared celular (Hiramatsu, 2001).

En los recientes años se han realizado estudios para determinar fenotípica y molecularmente cepas SAMR, demostrándose en una unidad de alto riesgo neonatal, por PCR, que el 93% de las cepas SARM poseían el gen *mecA* (Velasco *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha reportado ningún estudio de caracterización molecular de cepas SARM (Torres *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 2005).

En la mayoría de los países se conoce qué tipo de SCC*mec* circula; en Venezuela no se ha realizado la caracterización molecular de la meticilino resistencia de las cepas *Staphylococcus*, desconociéndose el tipo de SCC*mec* circulante en el país; el conocimiento del tipo de SCC*mec* ayudará a establecer medidas de

diseminación clonal de cepas y realizar seguimientos epidemiológicos importantes en caso de brotes epidémicos.

En el oriente del país, específicamente en el Servicio Autónomo del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA), en los recientes años, se han realizado estudios de serología, susceptibilidad y, en especial, detección de SAMR, pero no se ha caracterizado la metilina resistencia circulante en esta zona (Mata, 2003; Salazar, 2003; Lozada, 2004). Por lo anteriormente mencionado, se realizó la caracterización molecular de cepas SAMR aislados en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA en Cumaná, estado Sucre.

## **METODOLOGÍA**

### **Recolección de cepas**

Se colectaron 59 cepas de *Staphylococcus* aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA, durante un período de siete meses (enero a julio de 2007). Se tomó la fecha, susceptibilidad a los antibióticos y prueba de la coagulasa de las cepas. Se tomaron los datos de los pacientes incluyendo: nombres, apellidos, servicio, tipo de muestra. Estas muestras fueron trasladadas, semanalmente, hasta el Laboratorio de Microbiología del Postgrado de Biología Aplicada UDO, en tubos con agar base.

Una vez en el Laboratorio de Microbiología se cultivaron las cepas en placas de agar base, con el objeto de recuperarlas. De no obtenerse cultivos puros, se procedía a inocular la colonia de interés en caldo infusión cerebro corazón (BHI) e incubar a 37°C por 18 horas, y luego se sembraba nuevamente en placas de agar base hasta obtener cultivos puros. Posteriormente, se les realizó la tinción de Gram, para así observar bajo microscopio, su morfología, agrupación particular (racimos de uvas) y su coloración (Gram positivas).

Una vez obtenidas colonias puras, éstas fueron conservadas a -80 °C en el congelador del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IIBCA-UDO), en viales con BHI-glicerol al 20%.

### **Preparación del inóculo bacteriano**

Se hizo una inoculación directa, tomando una colonia con asa de la placa de

Petri que contenía la muestra a examinar y se agregó en tubos con 10 ml de solución fisiológica (0,9%), se mezcló para homogenizar la muestra, comparándose la turbidez con el patrón 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  microorganismos viables/ml). Si la turbidez era menor que la del patrón, se inoculaba otra colonia de la muestra a examinar, en caso contrario se agregaba solución fisiológica para diluirla.

### **Realización de los antibiogramas**

Los patrones de sensibilidad se determinaron mediante el método de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Los discos de antibióticos utilizados fueron: oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), teicoplanina (30 µg), vancomicina (30 µg) y novobiocina (5 µg), los cuales se colocaron siguiendo las normas establecidas por el M2-A9 del Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio (CLSI). Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas en aerofilia. Los halos inhibitorios fueron medidos en milímetros y, seguidamente, la lectura de los antibiogramas fue interpretada bajo los criterios del M2-A9. La cepa control fue *S. aureus* ATCC 25923, recomendada por el M2-A9, la cual es una cepa sensible a los antibióticos estudiados (CLSI, 2007).

### **Extracción de ADN**

El patrón de ADN se preparó extrayendo el ADN total de las cepas a través del Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Se obtuvo un cultivo nocturno de la cepa de trabajo a 37°C, se centrifugó 1,5 ml de cultivo por 2 minutos a 13 000 revoluciones por minuto (rpm), descartándose el sobrenadante, se resuspendieron las células en EDTA 50 mM, añadiéndose lisostafina 10 mg/ml y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Posteriormente se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm por 2 minutos y se

descartó el sobrenadante (en las muestras donde no se formó precipitado se agregó NaCl 5 mM). Luego se añadió solución de lisis y se resuspendió suavemente, incubándose a 80°C por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos.

A la muestra anterior se le añadió RNasa a 4 mg/ml, se mezcló invirtiéndose los tubos 5 veces, se incubó a 37°C por 1 hora, dejándose enfriar a temperatura ambiente, luego se le añadió solución precipitante, se vortexó, se incubó en hielo por 5 minutos y centrifugó por 3 minutos a 13 000 rpm.

El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio con isopropanol, se mezcló y centrifugó por 3 minutos a 13 000 rpm, descartándose el sobrenadante, se añadió etanol al 70%, se mezcló y centrifugó por 2 minutos a 13 000 rpm, se eliminó el etanol y se dejó secando al aire libre por 10 minutos. Una vez seco, se rehidrató el ADN en solución rehidratante durante toda la noche a 4°C; se almacenó el ADN rehidratado a 4°C hasta su uso.

### **Verificación de la extracción del ADN**

Se preparó un gel de agarosa al 1% coloreado con bromuro de etidio, el cual se hizo migrar en buffer TBE al 0,5X. Se agregaron 5 µl de ADN rehidratado y 3 µl de azul de bromofenol y se depositaron en gel de agarosa, utilizando lambda digerido por *PstI* como marcador de peso molecular. Se dejó correr por una hora a 80 miliamperios y 135 voltios. Terminada la corrida electroforética, el gel se reveló bajo transiluminador de luz ultravioleta en el Laboratorio de Genética Molecular del IBCA-UDO, se tomaron fotos para la verificación de la extracción del ADN y estimar la concentración de ADN a ser utilizado en la PCR.

### Identificación molecular del SCCmec en cepas SMR:

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *mecA* y de los diferentes *loci* específicos de cada tipo se señalan a continuación (Oliveira y de Lencastre, 2002):

Para el gen *mecA*:

MECA P4 TCCAGATTACAACCTTCACCAGG

MECA P7 CCACTTCATATCTTGTAACG

Para cada *locus*:

		SCCmec	Peso molecular
A	CIF2 F2: TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG CIF2 R2: ATTTACCACAAGGACTACCAGC	I	495pb
B	KDP R1: CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG KDP F1 AATCATCTGCCATTGGTGATGC	II	284pb
C	MECI P2: ATCAAGACTTGCATTCAGGC MECI P3: GCGGTTTCAATTCAGTTC	II, III	209pb
D	DCS F2 CATCCTATGATAGCTTGGTC DCS R1 CTAAATCATAGCCATGACCG	I, II, IV	342pb
E	RIF4 F3 GTGATTGTTTCGAGATATGTGG RIF4 R9 CGCTTTATCTGTATCTATCGC	III	243pb
F	RIF5 F10 TTCTTAAGTACACGCTGAATCG RIF5 R13 GTCACAGTAATTCCATCAATGC	III	414pb
G	IS431 P4 CAGGTCTCTTCAGATCTACG pUB110 R1 GAGCCATAAACACCAATAGCC	IA	381pb
H	IS431 P4 CAGGTCTCTTCAGATCTACG pT181 R1 GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	IIIA	303pb

Se utilizaron cuatro cepas controles, tres positivas: *S. aureus* 77906 (SAMR-

heterorresistente), 77907 (SAMR-Hospitalaria) y 77908 (SAMR-Comunitaria), un control negativo, *S. aureus* ATCC 25923. Los perfiles polimórficos se observaron bajo luz ultravioleta en gel coloreado con bromuro de etidio y se compararon visualmente en la corrida electroforética de la PCR múltiple de acuerdo a la talla en pares de base de cada fragmento (Oliveira y de Lencastre, 2002).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: buffer II 1X; 200  $\mu\text{mol/l}$  de dNTP, 200 nmol/l de los oligonucleótidos: KDP F1, KDP R1, RIF4 F3, y RIF4 R9; 400 nmol/l de cada oligonucleótido: CIF2 F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 y pT181 R1 y 800 nmol/l de los oligonucleótidos: DCS F2, DCS R2, MECA P4, MECA P7 y IS431 P4. 2 U de la *Taq* polimerasa ATE 500 U y 200 nanogramos de ADN patrón. Condiciones de amplificación: 4 min a 94°C de predesnaturalización; 30 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s, y 72°C por 1 min; postextensión de 4 min a 72°C; enfriamiento a 4°C. Revelado en agarosa al 2%, a 100 V por 120 minutos (Oliveira y de Lencastre, 2002).

### **Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias**

Las concentraciones mínimas inhibitorias se determinaron por el método de dilución estándar del CLSI en agar Müeller-Hinton, a las cepas a quienes les amplificó el gen *mecA*. Las placas con las diferentes concentraciones de oxacilina (0,06; 0,125; 0,25; 0,50; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 mg/l), se inocularon con 2  $\mu\text{l}$  del cultivo de la cepa a estudiar con una dilución de 1:10 del factor 0,5 McFarland, por depósito y fueron incubas en aerofilia a 35°C por 24 horas. La lectura fue interpretada bajo los criterios del M7-A7 del CLSI, se utilizaron cepas controles de *S. aureus* 77906 (control positivo) y *S. aureus* ATCC 25923 (control negativo).

## **Detección de la producción de betalactamasas**

Se detecto la producción de betalactamasas por el método de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Los discos de antibióticos utilizados fueron: ampicilina (10 µg) y ampicilina-sulbactam (10 µg), los cuales se colocaron siguiendo las normas establecidas por el M2-A9 del CLSI. Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas en aerofilia. Los halos inhibitorios fueron medidos en milímetros y, seguidamente, la lectura de los antibiogramas fue interpretada bajo los criterios del M2-A9.



## RESULTADOS

Se aislaron, en general, 352 cepas de *Staphylococcus* en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA durante un período de siete meses (enero a julio 2007), de las cuales, 59 cepas eran meticilino resistentes; en los casos que se tenía más de una cepa del mismo paciente se procedió a tomar una sola, para evitar los dobles creando sesgos en los resultados, obteniéndose al final un total de 50 cepas: 21 *S. aureus* y 29 *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN). Los servicios y los tipos de muestras de donde provenían las cepas de *S. aureus* durante los meses de estudio fueron diversos (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Procedencia de las cepas *Staphylococcus aureus* obtenidas durante los meses de enero a julio 2007 en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.

Servicio	Número
Emergencia Adultos	4
Medicina A	3
Ambulatorios	3
Cirugía Blanda	2
UCI	2
Pediatría B	2
Pediatría A	1
Diálisis	1
Trauma shock	1
Medicina C	1
Observación Adultos	1

Tabla 2. Tipos de muestras de las cepas *Staphylococcus aureus* obtenidas durante los meses de enero a julio de 2007 en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.

Muestra	Número
Secreción	17
Punta catéter	3
Espuito	1

En el caso de las cepas SCN, el servicio donde hubo un mayor aislamiento fue en la Unidad Neonatal (UN), como lo muestra la tabla 3. En la tabla 4 se puede evidenciar que la mayoría de las cepas de SCN, que se aislaron en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA, provenían de hemocultivos.

Tabla 3. Procedencia de las cepas *Staphylococcus coagulasa* negativa obtenidas durante los meses de enero a julio 2007 en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA

Servicio	Número
Unidad Neonatal	12
Trauma shock	2
Pediatría	2
UCI-Pediatría	2
UCI-adultos	1
Piso 6-A	1
Piso 6-B	1
Piso 6	1
Observación Pediátrica	1
Medicina B	1
Medicina C	1
Consulta Hematológica	1
Observación Adultos	1

Tabla 4. Tipos de muestras de *Staphylococcus* coagulasa negativa obtenidas durante los meses de enero a julio de 2007 en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.

Muestra	Presencia
Hemocultivo	15
Secreción	10
Catéter	4

El fenotipo de resistencia que prevaleció tanto en las cepas *S. aureus* como SCN se puede observar en las tablas 5 y 6.

La caracterización molecular de cepas *S. aureus* se puede observar en la tabla 9, las cepas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 13, 14, 17, 18, 20 y 21 amplificaron tres bandas, la primera banda para el *locus* A, una segunda banda representa el *locus* D y la última banda que corresponde al gen *mecA*. Este patrón corresponde al SCC*mec* tipo I (Oliveira y de Lencastre, 2002).

Tabla 5. Antibiotipos de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.

# Cepas	Oxa	Fox	Van	Tc	Cc	Eri	Nv
6	R	R	I	I	R	R	S
4	R	R	S	S	R	R	S
2	R	R	R	S	R	R	S
1	R	R	S	I	R	R	S
1	S	S	I	S	R	R	S
1	R	R	I	R	R	R	S
3	R	R	I	S	R	R	S
1	R	R	I	I	S	R	S
1	R	R	S	I	I	R	S
1	R	R	I	I	I	I	S

Oxa: Oxacilina. Fox: Cefoxitina. Van: Vancomicina. Tc: Teicoplanina. Cc: Clindamicina. Eri: Eritromicina. Nv: Novobiocina. R: resistente. I: resistencia intermedia. S: sensible.

Tabla 6. Antibiotipo de las cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativa aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.

# Cepa	Oxa	Fox	Van	Tc	Cc	Eri	Nv
9	R	R	I	I	R	R	S
8	R	R	S	S	R	R	S
1	S	S	S	S	S	S	S
2	R	R	I	I	S	S	S
1	R	S	S	S	S	S	S
1	S	R	S	S	R	R	S
1	R	R	S	I	R	R	S
2	R	R	I	S	R	R	S
2	R	R	S	S	S	R	S
1	R	R	I	S	S	S	S
1	R	R	S	I	R	I	S

Oxa: Oxacilina. Fox: Cefoxitina. Van: Vancomicina. Tc: Teicoplanina. Cc: Clindamicina. Eri: Eritromicina. Nv: Novobiocina. R: resistente. I: resistencia intermedia. S: sensible.

La cepa 4 amplificó para el *locus* A y para el gen *mecA*, no para el *locus* D, las cepas 5 y 11 amplificaron tres bandas iguales a las reportadas para SCC*mec* tipo I, además de una banda extra de 209 pb perteneciente al *locus* C. La cepa 9 solo amplificó para el gen *mecA*, mientras que las cepas 10 y 12 no presentan gen *mecA*, amplificando la cepa 10 *locus* A y la cepa 12, *locus* C. Las cepas 15, 16 y 19 de *S. aureus* amplificaron el *locus* D y el gen *mecA*, lo cual representa a SCC*mec* tipo IV.

En la tabla 7 la relación entre el fenotipo y el genotipo de cepas *S. aureus*, observándose así en la mayoría de los casos, salvo en la cepa 12, que se observó como meticilino resistente en el antibiograma y con la PCR no amplificó el gen *mecA*. En las cepas que amplificaron el gen *mecA* se determinó la CMI para oxacilina. La CMI para oxacilina en cepas *S. aureus*, la mayoría fue  $\geq 512$  mg/l, seguidos de tres cepas con CMI de 256 mg/l, una de 128 mg/l, tres de 64 mg/l y una de 2 mg/l.

En el caso de SCN, como puede apreciarse en la tabla 10, la cepa 1 presentó los *loci* A y H y el gen *mecA* y una banda desconocida de 220 pb, en la cepa 2 amplificaron los *loci* A, F, gen *mecA* más una banda desconocida de 260 pb.

Las cepas 3, 7 y 15 son SCC*mec* tipo IV, presenta el *locus* D y gen *mecA*, la cepa 4 los *loci* H y B, además del gen *mecA*. La cepa 5 amplificó para los *loci* A, G y F y el gen *mecA* y una banda desconocida de 220 pb. La cepa 6 presentó los *loci* G, D, H y el gen *mecA* y la banda desconocida de 220 pb.

La cepa 8 presentó *locus* A y gen *mecA*. Las cepas 16, 18, 27, 28 y 29 presentaron gen *mecA* y *locus* A, la cepa 9 presentó gen *mecA* y una banda desconocida de 260 pb, la cepa 10 solo posee gen *mecA*. La cepa 13 amplificó para el *locus* D, pero no el gen *mecA*.

Las cepas 11, 24 y 26, presentaron los *loci* A, D y el gen *mecA*, correspondiente al SCC*mec* tipo I. La cepa 14 amplificó para el gen *mecA*, los *loci* A, G y D, además de una banda desconocida de 260 pb, ubicándose como SCC*mec* tipo IA.

La cepa 19 presentó gen *mecA*, *loci* A y F y una banda de 260 pb, parecido a la cepa 20, que además, presentó una banda de 220 pb, la cepa 22 es SCC*mec* tipo I con una inserción de 220 pb.

Las cepas SCN 12, 17, 21, 23 y 25 no dieron ningún amplificado.

En la tabla 8, se compara el fenotipo y el genotipo de cepas SCN; la cepa 2 fue sensible en el antibiograma pero presentó gen *mecA*; la cepa 5 que muestra una discordancia entre los discos de oxacilina y cefoxitina, presentó gen *mecA*; las cepas 8, 12, 13, 17, 21, 23 y 25 que en el antibiograma se reportaron como meticilino resistentes no amplificaron gen *mecA*. En cepas portadoras del gen *mecA* se muestra la CMI para oxacilina.

La CMI para oxacilina en las cepas SCN, variaron entre cada cepa como puede observarse en la tabla 8.

A las cepas no portadoras del gen *mecA* se les realizó una prueba confirmatoria fenotípica de producción de betalactamasas con los antibióticos ampicilina (10 µg) y ampicilina-sulbactam (10/10 µg). Dos cepas *S. aureus* 10 y 12 y a las cepas SCN 8, 12, 13, 17, 21, 23 y 25. La cepa 10 de *S. aureus*, fue sensible a ampicilina y ampicilina-sulbactam; en el caso de la cepa 12, fenotípicamente resistente a meticilina, presentó resistencia a ampicilina y sensibilidad a ampicilina-sulbactam. Las cepas SCN 8, 13 y 25 resultaron resistentes a ampicilina y sensibles a ampicilina-sulbactam. Las cepas 12, 21 y 23, presentaron un delta mayor de 5 mm en los discos

de ampicilina y ampicilina-sulbactam. La cepa 17 fue resistente tanto a ampicilina como ampicilina-sulbactam.

Tabla 7. Fenotipo, genotipo, tipo de SCCmec y CMI en cepas *Staphylococcus aureus* aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA (enero a julio 2007).

Cepa	Oxacilina	Cefoxitina	Gen <i>mecA</i>	Tipo SCCmec	CMI
1	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
2	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
3	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
4	Resistente	Resistente	Positivo	ND	≥ 512 mg/l
5	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
6	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
7	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
8	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
9	Resistente	Resistente	Positivo	ND	256 mg/l
10	Sensible	Sensible	Negativo	NA	ND
11	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
12	Resistente	Resistente	Negativo	ND	ND
13	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
14	Resistente	Resistente	Positivo	I	256 mg/l
15	Resistente	Resistente	Positivo	IV	64 mg/l
16	Resistente	Resistente	Positivo	IV	256 mg/l
17	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
18	Resistente	Resistente	Positivo	I	128 mg/l
19	Resistente	Resistente	Positivo	IV	64 mg/l
20	Resistente	Resistente	Positivo	I	64 mg/l
21	Resistente	Resistente	Positivo	I	2 mg/l

NA: no aplica. ND: no determinado.

En la tabla 9, se observa la prevalencia de los diferentes *loci* en las cepas *S. aureus* aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA; no hubo amplificación para los *loci* E, F, G y H. Hay predominio de los *loci* A y D, ubicándose en SCC*mec* tipo I.

En el caso de SCN amplificaron la mayoría de los *loci* excepto C y E, observándose predominio de los *loci* A y D; una sola cepa amplificó para el *locus* B; en estas cepas solo 8 de las 29 SCN se lograron determinar el tipo de SCC*mec*, con muchas inserciones y bandas desconocidas que se repitieron, como la banda de 220 pb que aparece en cinco cepas y la de 260 pb en cuatro cepas, amplificando en la mayoría de los casos distintos *loci*. Cuatro cepas amplificaron el *locus* F, tres para el *locus* G y tres para el *locus* H como se observa en la tabla 10.

Tabla 8. Fenotipo, genotipo, tipo de SCC*mec* y CMI en cepas *Staphylococcus* coagulasa negativa aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA (enero a julio 2007).

Cepa	Oxacilina	Cefoxitina	Gen <i>mecA</i>	Tipo SCC <i>mec</i>	CMI
1	Resistente	Resistente	Positivo	ND	2 mg/l
2	Sensible	Sensible	Positivo	ND	1 mg/l
3	Resistente	Resistente	Positivo	IV	8 mg/l
4	Resistente	Resistente	Positivo	ND	64 mg/l
5	Resistente	Sensible	Positivo	ND	≥ 512 mg/l
6	Sensible	Resistente	Positivo	ND	2 mg/l
7	Resistente	Resistente	Positivo	IV	2 mg/l
8	Resistente	Resistente	Negativo	NA	ND
9	Resistente	Resistente	Positivo	ND	256 mg/l
10	Resistente	Resistente	Positivo	ND	≥ 512 mg/l
11	Resistente	Resistente	Positivo	I	≥ 512 mg/l
12	Resistente	Resistente	Negativo	NA	ND



Continuación de la Tabla 08.

13	Resistente	Resistente	Negativo	NA	ND
14	Resistente	Resistente	Positivo	IA	1 mg/l
15	Resistente	Resistente	Positivo	IV	8 mg/l
16	Resistente	Resistente	Positivo	ND	≥ 512 mg/l
17	Resistente	Resistente	Negativo	NA	ND
18	Resistente	Resistente	Positivo	ND	≥ 512 mg/l
19	Resistente	Resistente	Positivo	ND	32 mg/l
20	Resistente	Resistente	Positivo	ND	0.50 mg/l
21	Resistente	Resistente	Negativo	NA	ND
22	Resistente	Resistente	Positivo	I	1 mg/l
23	Resistente	Resistente	Negativo	NA	ND
24	Resistente	Resistente	Positivo	I	4 mg/l
25	Resistente	Resistente	Negativo	NA	ND
26	Resistente	Resistente	Positivo	I	4 mg/l
27	Resistente	Resistente	Positivo	ND	≥ 512 mg/l
28	Resistente	Resistente	Positivo	ND	≥ 512 mg/l
29	Resistente	Resistente	Positivo	ND	12 mg/l

NA: no aplica. ND: no determinado.

Tabla 9. Loci amplificados en la PCR múltiple en las cepas *Staphylococcus aureus* aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.

Cepa	<i>mecA</i>	A	C	D
1	X	X	-	X
2	X	X	-	X
3	X	X	-	X
4	X	X	-	-
5	X	X	X	X
6	X	X	-	X
7	X	X	-	X
8	X	X	-	X
9	X	-	-	-
10	-	X	-	-
11	X	X	X	X
12	-	-	X	-
13	X	X	-	X
14	X	X	-	X
15	X	-	-	X
16	X	-	-	X
17	X	X	-	X
18	X	X	-	X
19	X	-	-	X
20	X	X	-	X
21	X	X	-	X

X: presencia del gen *mecA* y de los loci A, C y D.

Tabla 10. Loci amplificados en la PCR múltiple en las cepas *Staphylococcus* coagulasa negativa aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA.

Cepa	<i>mecA</i>	A	B	D	F	G	H	Banda desconocida
1	X	X	-	-	-	-	X	220
2	X	X	-	-	X	-	-	260
3	X	-	-	X	-	-	-	-
4	X	-	X	-	-	-	X	-
5	X	X	-	-	X	X	-	220
6	X	-	-	X	-	X	X	220
7	X	-	-	X	-	-	-	-
8	-	X	-	-	-	-	-	-
9	X	-	-	-	-	-	-	260
10	X	-	-	-	-	-	-	-
11	X	X	-	X	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	X	-	-	-	-
14	X	X	-	X	-	X	-	260
15	X	-	-	X	-	-	-	-
16	X	X	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	X	X	-	-	-	-	-	-
19	X	X	-	-	X	-	-	260
20	X	X	-	-	X	-	-	220
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	X	X	-	X	-	-	-	220
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	X	X	-	X	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuación de la Tabla 10.

26	X	X	-	X	-	-	-	-
27	X	X	-	-	-	-	-	-
28	X	X	-	-	-	-	-	-
29	X	X	-	-	-	-	-	-

X: presencia del gen *mecA* y de los *loci* A, B, D, F, G y H.

## DISCUSIÓN

De las cepas de *S. aureus* aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA de los diferentes servicios (Tabla 1), predominaron las de emergencia adulto, ambulatorios y medicina A. La literatura reporta un mayor número de muestras provenientes de UCI y cirugía blanda (Morales *et al.*, 2007). El tipo de muestra de donde se obtuvieron las cepas *S. aureus* se correlaciona con lo reportado en la literatura (Tabla 2), donde la mayoría de estas muestras son obtenidas de secreciones, catéteres, esputo y exudados (De la Parte-Pérez *et al.*, 2003).

En el caso de SCN, se presentó un gran número de estas cepas aisladas de la Unidad Neonatal (Tabla 3), con pocos casos en los demás servicios y predominio de las cepas provenientes de pediatría (UCI-P, piso 6 y observación pediátrica) coincidiendo con lo reportado, tanto a nivel nacional como mundial, como los más susceptibles a infecciones por SCN, seguidos de pacientes de UCI, diálisis o inmunocomprometidos (Kloss y Bannerman, 1994).

En neonatos, al tener aislamientos de SCN duplicados en los hemocultivos y repetirse en dos de tres hemocultivos, se debe considerar como patógenos y no como contaminantes, como se observa normalmente en publicaciones de SCN; habría que considerar el perfil de susceptibilidad de cada cepa para inferir si se trata del mismo clon y que sean propios del paciente o de los diferentes servicios (Perazzi *et al.*, 2006). En este estudio, en los hemocultivos se aisló solamente SCN (Tabla 4), como lo reportado por Macero y Moreno (2007 a). En SCN, la muestra predominante, los hemocultivos, estuvo seguida de secreciones y catéteres, así como en *S. aureus* (Tabla 2).

La meticilina, el antibiótico de elección en el tratamiento de infecciones estafilocócicas, ha registrado un aumento en el patrón de susceptibilidad desde 1961 (Jevons, 1961). La resistencia a meticilina se detectaba hasta el 2004 con el disco de oxacilina, mediante la prueba de difusión en disco o antibiograma, debido a su estabilidad y sensibilidad superior a otras penicilinas estables a penicilinasas; reportar cepas meticilino resistentes es homólogo a oxacilino resistentes (Centro Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos NCCLS, 2004). A partir de enero de 2004, el uso de cefoxitina, una cefomicina (inductor más potente del sistema regulador *mecA*), es el método de elección para predecir resistencia a meticilina en cepas de SCN. Se usa el disco de oxacilina bajo recomendación del M2-A9 del CLSI. No obstante, la susceptibilidad a oxacilina es difícil de leer y desde el 2006, el CLSI recomienda el uso tanto de oxacilina como de cefoxitina (CLSI, 2006).

En los trabajos realizados en Venezuela, después de la normalización del uso del disco de cefoxitina, no se monta en todos los laboratorios este disco, para la detección de la meticilino resistencia (Lozada, 2004; Álvarez *et al.*, 2005; Requena *et al.*, 2005; Tedesco *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 2005; Vivas *et al.*, 2005). El CLSI (2006) recomienda, tanto para *S. aureus* como para SCN el uso de discos de oxacilina y cefoxitina, ya que la molécula de oxacilina en ocasiones puede dar resultados de falsa resistencia, debido a que la concentración del taxo se pierde rápidamente y por otro lado, no es capaz de inducir la meticilino resistencia en *S. aureus* o presenta una falsa resistencia en SCN.

En el caso de SCN es aún mayor la importancia de la colocación de los dos discos, porque como en la mayoría de los casos, en el trabajo diario de laboratorio no se identifican las especies de SCN; en el caso de *S. saprophyticus* y *S. lugdunensis* no se debe colocar el disco de oxacilina porque arroja resultados falsos, se puede observar resistencia fenotípica en ausencia del gen *mecA*. En los laboratorios clínicos públicos que no cuentan con técnicas moleculares para detectar la presencia del gen

responsable de dicha resistencia, es el uso del disco de cefoxitina el que infiere la presencia de cepas *mecA* positivas (Dourado *et al.*, 2007).

Es necesario colocar ambos discos para inferir la presencia del gen *mecA* en *S. aureus* en los laboratorios clínicos que no poseen técnicas más precisas para detectar la meticilino resistencia, como lo es la PCR.

En cuanto al antibiotipo, se puede observar en la tabla 5 que 20 cepas de *S. aureus* fueron resistentes a oxacilina y cefoxitina. Son resultados que coinciden con lo reportado en Cumaná por Mata (2003) en pacientes con cuadro febril recluidos en el SAHUAPA en el cual reporta 15% de resistencia a oxacilina. Mientras que Salvemini (2003), quién trabajó con cepas *S. aureus* en manipuladores de alimentos en Cumaná reportó una sensibilidad a oxacilina de 100%.

En Caracas, en el Instituto Médico La Floresta, se reportó 95% de resistencia a oxacilina en un estudio entre el 2001 y el 2006 (Cáceres *et al.*, 2007) y 64% de resistencia en el Hospital Vargas (Morales *et al.*, 2007), con alta resistencia a oxacilina, distinto a lo encontrado en Cumaná, pero igualmente se notó que el porcentaje de resistencia ha ido incrementándose.

Con el transcurrir de los años y el uso indiscriminado de betalactámicos, se ha observado un cambio en el porcentaje de resistencia a oxacilina en Ciudad Bolívar, Villarroel *et al.* (1979) halló 48.2% resistencia a oxacilina; Salazar (2003) en cepas aisladas de individuos con furunculosis, observó 75% resistencia a meticilina y Lozada (2004) señaló 45% de resistencia a oxacilina en cepas provenientes de infecciones tanto nosocomiales como comunitarias.

En este trabajo se demostró que existe una relación directa entre el fenotipo de meticilino resistencia observado en *S. aureus* con los discos de oxacilina y cefoxitina

y la presencia del gen *mecA*. Con el uso de los oligonucleótidos MECA P4 y MECA P7, se pudo poner en evidencia directa la presencia de la PBP2' o PBP2a, la cual le confiere la metilino resistencia al género *Staphylococcus*. Hubo una sola excepción para *S. aureus*; la cepa 12, oxacilina y cefoxitina dieron resistentes cuando *mecA* estaba ausente (Tabla 5). A esta cepa se le hizo una comprobación fenotípica de producción de betalactamasa y dio positiva. Las cepas con falsos negativos para la metilino resistencia, es decir antibiogramas con resistencia a los discos de oxacilina y cefoxitina pero gen *mecA* negativos, pueden ser el resultado de una sobreproducción de penicilinasas o sobre expresión o alteraciones de PBP constitutivas, ya que está demostrado que las penicilinas estables a penicilinasas se pueden ver alteradas cuando estas enzimas están presentes (Dourado *et al.*, 2007). Se descarta que la cepa 12 de *S. aureus* tenga alteraciones en las PBP constitutivas puesto que la combinación del disco ampicilina-sulbactam recuperó la actividad de ampicilina.

En SCN hubo 10 casos de discordancia en la detección de la metilino resistencia (Tabla 8); hubo un grupo de siete SCN que resultaron negativos para el gen *mecA* y fenotípicamente eran resistentes a oxacilina y cefoxitina en el antibiograma. Las cepas 12, 21 y 23 son hiperproductoras de penicilinasas, mientras que 8, 13 y 25 son productoras de betalactamasas. La cepa SCN 17, la cual resultó resistente tanto a ampicilina como ampicilina-sulbactam, en ausencia del gen *mecA* indica que su mecanismo de resistencia a los betalactámicos no es ni la producción de PBP2a ni de penicilinasas, se debe a una alteración de PBP constitutivas. Suzuki *et al.* (1992) describió alteraciones en la cantidad de PBP1 y PBP4 en *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus*.

El otro caso de discordancia se observó en las cepas SCN 2 y 5; en la cepa 2, los discos de cefoxitina y oxacilina dieron sensibles cuando era portadora del gen *mecA*. En un trabajo realizado en Argentina, se observó el mismo caso en tres cepas



SCN, dos *S. epidermidis* presentaron halos de inhibición de 16 y 21 mm, respectivamente, para oxacilina y  $\geq 30$  mm para cefoxitina, cuando realmente eran *mecA* positivos (Perazzi *et al.*, 2006). La cepa 5 que reportó disociación entre el disco de oxacilina y cefoxitina, resultando sensible a cefoxitina, distinto a lo que indica Dourado *et al.*, 2007, el cual reporta la importancia del disco de cefoxitina para inducir la presencia del gen *mecA*, esta cepa se colocó como resistente a oxacilina por presentar colonias intrahalos.

De las siete cepas con antibiogramas resistentes a meticilina con *mecA* negativo se descarta la posibilidad de que existan cepas *S. lugdunensis*, ya que normalmente esta especie carece de los genes que codifican para PBP2a y la penicilinas, siendo completamente susceptibles a los betalactámicos (Hussain *et al.*, 2000). Algunos reportes indican que todas las cepas son resistentes a los betalactámicos, característica que junto a la ornitina descarboxilasa han sido utilizados como métodos de identificación para *S. lugdunensis* (Losada *et al.*, 2003). Se debió realizar la CMI en estas cepas, para establecer el rango con respecto a oxacilina, sin embargo, por estar carente del gen *mecA* deben considerarse sensibles a oxacilina. Existen cepas *S. lugdunensis* que transportan el gen *mecA* con una CMI  $\geq 256$  mg/l (Tee y Lim, 2003). La falta de técnicas exactas para determinar *S. lugdunensis* crea problemas para determinar su perfil de resistencia, siendo la PCR el método de elección para determinar la meticilino resistencia (Horstkotte *et al.*, 2002).

Hederstierna-Johnsen *et al.* (2005) demostraron que el uso de cefoxitina de 10  $\mu\text{g}$  en agar Iso-Sensitest, con diámetros  $\leq 22$  mm para resistencia y  $\geq 27$  mm para susceptibilidad, tiene 100% sensibilidad para predecir la meticilino resistencia en SCN aislados de los hemocultivos.

En este estudio se utilizó la recomendación del manual del CLSI, 2007, con una carga de 30  $\mu\text{g}$  en agar Muëller-Hinton. Sería interesante hacer un estudio bajo estas

condiciones en las cepas provenientes de los hemocultivos de la UN, ya que la mayoría de los SCN provienen de ese servicio y se ha demostrado que en *S. epidermidis* el disco de 30 µg de cefoxitina fracasó en la detección de cepas *mecA* positivas (Frigatto *et al.*, 2005). No obstante, Pottumarthy *et al.* (2004) demostró que el disco de cefoxitina de 30 µg presenta pocos errores (falsa susceptibilidad), para predecir la meticilino resistencia.

A las cepas de *S. aureus* positivas para el gen *mecA* se les realizó la CMI (ver tabla 7), resultando las cepas 1-8, 11, 13 y 17 con una concentración de oxacilina  $\geq$  512 mg/l, lo que indica que son clase 4, son cepas con resistencia homogénea, estas células muestran altos niveles de resistencia, CMI de 400 a 1000 mg/l (Tomasz *et al.*, 1991). Las cepas 9, 14 y 16 con CMI de 256 mg/l, la cepa 18 con CMI 128 mg/l y las cepas 15, 19 y 20 con 64 mg/l, las cuales tienen altos niveles de resistencia, se ubicaron en la clase 3, que va desde 50 a 200 mg/l de oxacilina. La cepa 21 resultó con heterorresistencia por tener una CMI de 2 mg/l para oxacilina, conteniendo un número pequeño de bacterias resistentes (Tomasz *et al.*, 1991).

A las cepas SCN 5, 10, 11, 16, 18, 27 y 28, que presentaron gen *mecA*, se les realizó la CMI, ubicándose las cepas como clase 4, con CMI  $\geq$  512 mg/l a oxacilina, (Tomasz *et al.*, 1991). La cepa 4 (64 mg/l), 9 (256 mg/l) y 19 (32 mg/l), pertenecen a la clase 3 según su CMI, la cual va de 50 a 200 mg/l de oxacilina, son cepas con altos niveles de resistencia, a pesar de que tienen resistencia heterogénea. Las cepas 3, 15 (8 mg/l) y 29 (12 mg/l) de CMI para oxacilina, se ubican en la clase 2, en un rango de 6 a 12 mg/l de CMI para oxacilina; esta clase es la más frecuente en cepas resistentes a oxacilina. Las cepas 1, 6 y 7 (2 mg/l), 24 y 26 (4 mg/l) de CMI para al oxacilina, son heterorresistentes por tener una CMI de 2 mg/l para oxacilina, conteniendo un número pequeño de bacterias resistentes (Tomasz *et al.*, 1991). Las cepas 2 y 14 (1 mg/l), 20 (0,50 mg/l) y 22 (1 mg/l), no entran dentro de la clasificación de la meticilino resistencia por CMI para oxacilina. A pesar de poseer

gen *mecA*, tienen CMI por debajo del límite inferior para la meticilino resistencia establecido por Tomasz *et al.* (1991). Estas cepas son consideradas pre-meticilino resistentes; este fenómeno ha sido descrito en cepas *S. aureus*. Se ha demostrado que su transcripción está fuertemente reprimida por los genes reguladores (Hiramatsu *et al.*, 1991; Hiramatsu, 1995) y poco después, fueron identificados SCN como pre-meticilino resistentes pese a albergar el gen *mecA* (Hussain *et al.*, 2000).

En Cumaná no se han reportado estudios de SCN, por lo tanto no se cuenta con datos de referencia. Cuevas *et al.* (1999), han reportado mayor resistencia en SCN que en *S. aureus*; los resultados aquí obtenidos son contrarios a esto; eso podría deberse a que en el caso de aislamientos de SCN de sitios estériles y de piel y partes blandas se toman como flora colonizante, descartándose las cepas sin practicarle pruebas de susceptibilidad antibiótica, por lo tanto no se puede conocer su perfil de susceptibilidad; durante este estudio muchas cepas SCN fueron descartadas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA al inicio, lamentablemente no se pudieron estudiar. Es por esta razón, que se debería realizar un análisis de todos los SCN para detectar su perfil de susceptibilidad y la relación con infecciones nosocomiales y comunitarias.

En Venezuela es necesario un estudio para la identificación a nivel de especie de SCN para conocer la frecuencia de cada especie y su relación con infecciones específicas, como los reportados en estudios de vigilancia epidemiológica a nivel mundial, ya que no se realiza como rutina en el Laboratorio de Bacteriología clínica en ningún hospital del territorio venezolano; el continuo aislamiento de SCN de hemocultivos suele tomarse como contaminación al momento de la toma de muestra, por formar parte éstos de la flora normal. Sin embargo, a nivel internacional se les relaciona cada vez más como causantes de infecciones nosocomiales, especialmente en neonatos, niños y adultos con sistema inmune comprometido, además de estar asociados a altas tasas de mortalidad (Kloss y Bannerman, 1994). *S. saprophyticus*,

junto con *S. hominis* y *S. epidermidis* son las especies más aisladas en infecciones nosocomiales (Raz *et al.*, 2005).

En los antibiogramas se colocaron otros discos como eritromicina y clindamicina para detectar la resistencia de estas cepas a un grupo de antibióticos llamados macrólidos-lincosaminas-estreptograminas. Se observó qué tipo de resistencia fenotípica presentaban estas cepas, en la mayoría de los casos fue una resistencia MLS<sub>B</sub> constitutiva. Macero y Moreno (2007 b) y Serrano *et al.* (2007), señalan 33% y 23 %, de resistencia constitutiva, respectivamente. Estos antibióticos son considerados terapias alternativas en pacientes alérgicos a betalactámicos; se observó una cepa, con resistencia inducida a este grupo, evidenciándolo por la prueba D positiva, observándose un achatamiento del halo de clindamicina (2 µg) ante el de eritromicina (15 µg) en la cepa 6 SCN. Contrario a este trabajo, Macero y Moreno (2007 b), reportaron 29% de estas cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible. No se detectó ninguna cepa con el mecanismo de bomba de eflujo.

Desde la aparición de cepas SARM, en la década de los 60, aumentó el uso de la vancomicina a nivel hospitalario para tratar infecciones graves por cocos Gram positivos (Ena *et al.*, 1993). En el caso de vancomicina, 13 cepas de *S. aureus* presentaron susceptibilidad disminuida o resistencia intermedia (SAIV) y 2 cepas con resistencia a vancomicina (SARV); en Venezuela no se han reportado cepas SAIV ni SARV; colonias intrahalos fueron detectadas en algunas cepas, lo cual es indicativo de cepas SAIV.

A nivel mundial, las únicas cepas SARV aisladas desde 2002 hasta 2005, han sido localizadas en Estado Unidos (Johnson y Woodford, 2002; Miller *et al.*, 2002; Kacica y McDonald, 2004; Sievert *et al.*, 2002; Michigan Department of Community Health, 2005). Los primeros dos aislamientos de 2002 provenían de Michigan con CMI de 128 µg/ml y Pennsylvania con CMI de 64 mg/l para vancomicina (Weigel *et*

*al.*, 2003; Tenover *et al.*, 2004); estas cepas son portadoras del elemento extracromosómico Tn1546, el cual transporta el operón *vanA*, responsable del alto nivel de resistencia a glicopéptidos en *Enterococcus*; luego, en 2004 se aisló en New York (Kacica y McDonald, 2004). Dicho esto, las dos cepas SARV aisladas en este estudio deben ser analizadas en profundidad para determinar si realmente son cepas portadoras de un operón de resistencia a los glicopéptidos como las reportadas anteriormente o presentan algún mecanismo no identificado hasta ahora.

Las primeras cepas con susceptibilidad disminuida a vancomicina y/o teicoplanina en *Staphylococcus* fueron mal categorizadas como resistentes (Schwalbe *et al.*, 1987; Veach *et al.*, 1990; Sieradzki *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999; Tenover, 1999; Tenover *et al.*, 2001), debido a que su mecanismo de resistencia no estaba codificado por la presencia de un operón de resistencia a glicopéptidos descritos en *Enterococcus*, sino por un aumento del grosor de la pared (Hanaki *et al.*, 1998). Desde el siglo pasado, en todas partes, se han aislado *Staphylococcus* con susceptibilidad disminuida a glicopéptidos (Daum *et al.*, 1992; Centers for Disease Control and Prevention, 1997; Hiramatsu *et al.*, 1997; Garrett *et al.*, 1999; Centers for Disease Control and Prevention, 2000).

En el caso de SCN, la susceptibilidad disminuida a vancomicina fue menor que en *S. aureus*, pero igualmente es la primera vez que se detectan en el país este tipo de cepas. Caso parecido ocurrió en SCN, no se reportó ninguna cepa SCN-RV, pero si SCN-IV. Center *et al.* 2003 reportaron en UCI neonatal, susceptibilidad reducida a vancomicina en 3,9 % de los aislados de SCN, identificados el 75% como *S. warneri*.

Nakipoglu *et al.* (2005) reportaron 1,2% de susceptibilidad disminuida a teicoplanina en *S. aureus*. Se podría utilizar teicoplanina como terapia alternativa en *S. aureus* aunque se le debe realizar un seguimiento de vigilancia de resistencia bacteriana para determinar si hay aumento en la resistencia a teicoplanina en estas

cepas. SCN no presentó resistencia, aunque se tiende a relacionar a SCN con sensibilidad disminuida a teicoplanina, se observó mayor porcentaje en *S. aureus*, pudiéndose utilizar como terapia alternativa en SCN. Estos resultados son distantes de lo reportado en la literatura (Goldstein *et al.*, 1990; Sieradzki *et al.*, 1998). Siempre hay que montar en el antibiograma, tanto el disco de vancomicina como el de teicoplanina, ya que ninguno es excluyente del otro.

En el perfil de susceptibilidad de *S. aureus* y SCN hubo predominio de cepas resistentes a oxacilina, cefoxitina, clindamicina y eritromicina, con susceptibilidad disminuida a vancomicina y a teicoplanina (Tablas 5 y 6), lo que representa una guía para el médico a la hora de administrar una terapia antibiótica empírica y predecir el perfil de resistencia de estas cepas a los antibióticos.

En la caracterización molecular de cepas *S. aureus*, las cepas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 13, 14, 17, 18, 20 y 21 amplificaron para el *locus* A, el *locus* D y el gen *mecA*; este perfil es característico de *SCCmec* tipo I (Oliveira y de Lencastre, 2002). Este tipo de *SCCmec* fue identificado en 1961 en Reino Unido; posee gen *mec* clase B y complejo *ccr* tipo 1 (Hiramatsu *et al.*, 2002). Este tipo no tiene ningún plásmido o transposón que le confiera resistencia a algún otro antibiótico distinto a meticilina o algún metal (Ito *et al.*, 2001), a diferencia del tipo IA, el cual difiere del tipo I por la presencia de la integración del plásmido pUB110 (Shore *et al.*, 2005).

La PCR múltiple utilizada (Oliveira y de Lencastre, 2002) no es capaz de discriminar algunos subtipos, pudiéndose observar fallas con los oligonucleótidos aquí empleados; las cepas 5 y 11, presentaron *loci* A y D además del gen *mecA*, específicas de *SCCmec* tipo I, pero presentaron una banda extra, la cual corresponde al tamaño amplificado para el *locus* C, el gen regulador *mecI*. Estas cepas pudieran ser tipo I con una inserción del *locus* C y estar en presencia de un rearrreglo del complejo *mec* clase A y B en estas cepas.

La PCR múltiple utilizada amplifica SCC*mec* del tipo I al IV, además de los tipos o subtipos IA y IIIA; los subtipo IA y IIIA están definidos por la presencia de pUB110 y la ausencia de pT181, respectivamente. La subtipificación de la caracterización de la meticilino resistencia puede lograrse utilizando la PCR múltiple de Zhang *et al.* (2005), la cual pudiese ser utilizada para las cepas tipo IV de *S. aureus* 15, 16 y 19 y SCN 3, 7 y 15, ya que hay 100% de concordancia en los tipos del I al IV, excepto para las cepas tipo V. La metodología propuesta por Oliveira y de Lencastre (2002), caracteriza falsamente este tipo V como tipo III. El método de Zhang *et al.* (2005) tiene un mayor poder discriminatorio para la clasificación de tipos y subtipos. Se encontraron trece aislamientos que no fueron tipificables: cinco cepas tenían múltiples bandas y ocho solamente amplificaron para el gen *mecA* por el método empleado, dichos aislamientos fueron clasificados por la PCR múltiple de Oliveira. No obstante, se han descrito los tipos IVA, IVB, IVC, IVD, V y VI (Shore *et al.*, 2005), para lo cual sería altamente recomendable realizar otras PCR múltiples para identificar qué tipo de SCC*mec* existe en las cepas no identificadas en este trabajo.

La importancia de la actualización de la PCR múltiple de Milheiriço *et al.* (2007), el mismo grupo de investigación de Lencastre, en Portugal, es la tipificación del complejo *ccr*, además permite la caracterización de los SARM asociados a la comunidad (SARM-AC), lo cual corresponde a los tipos IV (IVE, IVG, IVH) y V. La PCR de Oliveira y de Lencastre (2002) se diferencia de la de Milheiriço *et al.* (2007), en cuatro pares de oligonucleótidos, de los cuales dos están destinados para la tipificación del SCC*mec* tipo V.

La cepa 4 de *S. aureus* y 16, 18, 27, 28 y 29 de SCN poseen *locus A* y gen *mecA*, pudiera tratarse de SCC*mec* tipo I con una delección del *locus D* (Oliviera y de Lencastre, 2002). pUB110, normalmente hallado en SCC*mec* tipo II, confiere resistencia a los aminoglucósidos kanamicina, tobramicina y bleomicina (Ito *et al.*,

1999). La delección o incorporación de pUB110 ha sido reportado anteriormente; el tipo SCC*mec* tipo IA pudo haber evolucionado del tipo I o viceversa (Oliveira *et al.*, 2001). Así como se ha encontrado pUB110 en SCC*mec* tipo IV (Oliveira y de Lencastre, 2002) y en SCC*mec* tipo III (Wielders, 2003).

El complejo *mec* clase B, propio del tipo SCC*mec* tipo I y IV, tiene secuencias de inserciones, IS1272 e IS431. Las cuales son capaces de producir varios tipos de rearrreglos en el genoma, incluyendo delecciones o inserciones (Mahillon *et al.*, 1999). IS431 es conocida por servir como sitio de depósito a múltiples genes de resistencia (Matthews y Tomasz, 1990) así no es raro notar que pUB110 y pT181 tengan copias integradas en ellos, demostrándose la presencia de dos copias de IS431 en cepas SCC*mec* tipo II y tipo III (McKenzie *et al.*, 1986; Dubín *et al.*, 1991), sugiriendo que estos plásmidos se hayan integrado por eventos cruzados de recombinación homóloga, por una copia en el cromosoma y otra en el plásmido (Skinner *et al.*, 1988).

Las cepas 15, 16 y 19 de *S. aureus* amplificaron el *locus* y el gen *mecA*, identificándose como SCC*mec* tipo IV; el cual es responsable de infecciones adquiridas en la comunidad (Ma *et al.*, 2002), es un elemento pequeño que no lleva genes de resistencia asociadas al gen *mecA* (Oliveira y de Lencastre, 2002). El SCC*mec* tipo IV presenta múltiples subtipos y es altamente transmisible. Los cuatro tipos son IVA, IVB, IVC y IVD, difieren cada uno por la región downstream del complejo *ccr* (Shore *et al.*, 2005).

La cepa 9 sólo posee gen *mecA*; es necesario realizar PCR con otros oligonucleótidos distintos a los aquí usados para verificar si amplifica para los nuevos tipos descritos de SCC*mec*, o quizás sea un tipo nuevo. Esto ha sido reportado previamente por Zhang *et al.* (2005), donde tuvo 8 aislamientos que no amplificaron para ningún elemento SCC*mec*, pero si *mecA*, uno de estos elementos fue identificado



tipo IV por el método de Oliveira y 7 tenían tipificaciones incongruentes por los dos tipos de clasificación, lo que representaría nuevas variantes de tipos o subtipos.

Tanto la cepa 10 como la 12 de *S. aureus* no amplificaron el gen *mecA*. Pero si amplificaron para el *locus* A; la cepa 12 amplificó el *locus* C, indicando que tienen parte del *SCCmec*, por lo tanto, no son resistentes a los betalactámicos. Luong *et al.* (2002) encontró una cepa de *S. aureus* con características esenciales del elemento SCC a quien le faltaba el gen *mecA*. La cepa 8 de SCN no presentó gen *mecA* pero si amplificó para el *locus* A, lo cual ejemplifica que SCC es un elemento móvil, que se encuentra en partes del genoma de *Staphylococcus*, además que la incorporación de la resistencia de *S. aureus* provino de SCN. SCC es un elemento móvil básico que sirve como vehículo para el intercambio de genes entre especies de *Staphylococcus*, genes asociados de resistencia a otros antimicrobianos (Ito *et al.*, 2001). Esto también ha sido reportado en *S. hominis*, en una cepa de Tokyo, en la cual se encontraron elementos SCC en su genoma, pero era una cepa metilino sensible (Katayama *et al.*, 2003).

SCN 3, 7 y 15 amplificaron dos bandas para el *locus* D y el gen *mecA*, lo que los ubica como *SCCmec* tipo IV, asociado a la comunidad. Sin embargo, las dos primeras cepas son de la UN y la 15 pertenece al piso 6A, lo que indica que son cepas asociadas a la comunidad diseminadas en ambientes hospitalarios.

Las cepas 11, 24 y 26 amplificaron los *loci* A y D y el gen *mecA*, ubicándolas en *SCCmec* tipo I; es el clon más antiguo descrito, le confiere resistencia a otros antimicrobianos distintos a los betalactámicos (Ito *et al.*, 2001). La cepa 22 pudiese ser igualmente *SCCmec* tipo I con una inserción de 220 pb, la cual se necesita secuenciar para su identificación.

Las cepas SCN anteriores, fueron las que se pudieron determinar en sí que tipo

de SCC*mec* con la técnica de PCR múltiple, las demás cepas variaron, no pudiéndose ubicar en ninguno de los SCC determinados por la PCR múltiple utilizada en este trabajo (Oliveira y de Lencastre, 2002).

La cepa 1 de SCN amplificó para los *loci* A y H, y gen *mecA*, (la secuencia de inserción IS431 y el plásmido pT181) y una secuencia desconocida de 220 pb. El *locus* H está asociado a pT181 que confiere resistencia a tetraciclinas, no se ha descrito este tipo SCC*mec* por lo que se sugiere otros oligonucleótidos para determinar el tipo, así como con las cepas 14, 19 y 20.

La cepa de SCN 2 amplificó para los *loci* A y F; este último posee el transposón Tn554 (insertado en el gen *orfX*), que provee resistencia a eritromicina y espectinomicina (Oliveira y de Lencastre, 2002). En la cepa se encontró una banda extra de 260 pb, la cual es desconocida. Esta cepa amplificó para el gen *mecA* pero su antibiograma fue susceptible a ambos antibióticos, lo cual pudiera estar indicando un bajísimo nivel de expresión de la heterorresistencia a meticilina, como ha sido reportado anteriormente (Schaeffler *et al.*, 1981).

La cepa 4 amplificó los *loci* H y B y gen *mecA*. El *locus* B es interno del operón *kdp* el cual es específico para SCC*mec* tipo II y el *locus* H es específico del SCC*mec* tipo IIIA (Oliveira y de Lencastre, 2002); por lo tanto no se puede establecer a qué tipo de SCC*mec* pertenece, debido a que para ser tipo II debió amplificar para los *loci* C y D, pudiera ser tipo IIIA con inserción del *locus* B. Se necesita realizar otra PCR con otros oligonucleótidos para su mejor identificación.

La cepa 5 amplificó los *loci* A, H y G, el último *locus* lleva inserto el plásmido pUB110 (Oliveira y de Lencastre, 2002), una región específica de 260 pb, pudiendo inferirse que se trata de una reorganización genética (McGeachie y Daley, 2000).

La presencia de los *loci* G y H indica que hay dos IS431 en esta cepa, aunado a su bajo nivel de resistencia a meticilina (CIM 2 mg/l), además la ausencia del *locus* A sugiere que se está en presencia de *S. haemolyticus*. Esto ha sido reportado anteriormente por Katayama *et al.* (2001), en donde, de 38 cepas *S. haemolyticus* 5 presentaban CMI de 1 a 4 mg/l, en estas 5 cepas, IS431L estaba localizada del lado izquierdo exacto del gen *mecI*, formando la estructura del complejo *mec* clase A. No obstante, en otras cepas de *S. haemolyticus* IS431L estaba asociado con una delección en ambos genes de regulación, formando el complejo *mec* clase C. Se han descrito tres complejos *mec* tradicionales en SCN (C1, C2 y D), mientras que C2 es típico de *S. haemolyticus* (Katayama *et al.*, 2001). Por lo tanto, para poder tipificar esta cepa hay que utilizar la metodología de Shore *et al.* (2005).

Tanto la cepa 9 como la 10 de SCN presentaron gen *mecA*, pero no amplificaron para algunos de los *loci* conocidos, lo que se sugiere realizar PCR con oligonucleótidos distintos a los utilizados; en el caso de la cepa 9 presentó una amplificación en la región no específica de 260 pb, la cepa 13 tampoco presentó gen *mecA*, pero amplificó para el *locus* D, lo que puede tratarse de una reorganización genética.

Las cepas SCN 1-4, 6-8, 12-15, 17 y 19-26 y 29, tienen bajo nivel de resistencia a meticilina, aún cuando no presentaron amplificación del *locus* C; contrariamente de las cepas SCN 5, 9, 10, 11, 16, 18, 27 y 28, que tienen alto nivel de resistencia. El gen *mecI* codifica un fuerte represor de la transcripción del gen *mecA*, el cual está presente en las cepas pre-meticilino resistentes, mostrando un nivel marginal de resistencia con CMI  $\leq 8$  mg/l (Hiramatsu, 1995; Hiramatsu *et al.*, 1996). Al respecto, Suzuki *et al.* (1993), demostró que el gen *mecI* está ampliamente diseminado en SCN, contrariamente a lo reportado en este trabajo. Dickinson y Archer (2000), demostraron que *S. epidermidis* con muy bajo nivel de resistencia estaba intacto el gen *mecI*. En este trabajo, las cepas SCN 1, 2, 3, 6, 7, 14, 20 y 22 son portadoras del

gen *mecA* y sin embargo presentan un bajo nivel de resistencia a meticilina, esto ha sido reportado por Hussain *et al.* (2000) anteriormente. De estas 8 cepas, 4 son pre-meticilino resistentes.

Las cepas SCN 8, 12, 13, 17, 21, 23 y 25 no amplificaron para el gen *mecA*. De estas 7 cepas SCN, solo dos amplificaron para elementos del SCC. La cepa 8 amplificó para el *locus* A y la cepa 13 para el *locus* D. Esto ha sido reportado anteriormente en la literatura, como es el caso del estudio realizado en Texas por Mongkolrattanothai *et al.* (2004), quienes identificaron cepas *S. epidermidis* con dos nuevos miembros de la familia SCC, que no transportaban el gen *mecA*. Por otro lado, Katayama *et al.*, (2003) estudió 27 cepas y encontró 3 cepas SCN, *S. arlettae*, *S. auricularis* y *S. hominis*, meticilino sensibles, portadoras de genes *ccr*, responsables de la transferencia del elemento *mec*. Concluyendo que la existencia de SCC, sin gen *mecA*, es indicativo de que el elemento SCC sirve como vehículo de transferencia de varios marcadores de resistencia entre especies estafilocócicas.

En SCN, hubo 16 cepas que amplificaron el *locus* A; solo 5 pudieron ser clasificadas como SCC*mec* tipo I. Las otras 11 cepas no pudieron ser clasificadas ya que las bandas amplificadas no corresponden a tipos conocidos. No obstante, la presencia del *locus* A, permite sugerir que son *S. sciuri*. El *locus* A corresponde a la región downstream del gen *pls*. Este gen codifica a una gran proteína de superficie que media la agregación bacteriana y actúa como un factor de virulencia (Huesca *et al.*, 2002; Josefsson *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que el gen *pls* es común en *S. sciuri* (Juuti *et al.*, 2005). El origen de *mecA* ha sido especulado provenir de un ancestro de especies SCN, siendo principalmente, *S. sciuri*, la especie sospechada albergar el elemento SCC*mec* u otra especie cercanamente evolutiva (Wu *et al.*, 1996), ya que un homólogo a *mecA* con 88% de similitud en la secuencia de amino ácidos ha sido hallado en todas las cepas

*S. sciuri*. Esta es la especie taxonómicamente más primitiva de *Staphylococcus* y está comprometida en infecciones animales y como comensal del medio ambiente (Kloos *et al.*, 1976; Kloos *et al.*, 1997).

*S. sciuri* está raramente asociado a colonización o infección en humanos, pero ocasionalmente ha sido hallado de muestras clínicas humanas (Adegoke, 1986; Hébert *et al.*, 1988; Murakami *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1992; Desroys du Roure *et al.*, 1993; Udo *et al.*, 1995; Couto *et al.*, 1996; Kloos *et al.*, 1997; Kolawole y Shittu, 1997; Hedin y Widerström, 1998).

Debido a que la totalidad de estas cepas provienen de la UN del SAHUAPA, es de vital importancia determinar su papel en los procesos infecciosos; saber si son verdaderos patógenos o son contaminación ambiental al momento de la toma de la muestra, ya que si son patógenos como tales, sería el primer brote reportado en Venezuela por esta especie.

Las cepas *Staphylococcus*, tanto SCN como *S. aureus*, aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA, presentaron un perfil de susceptibilidad altamente resistentes a los antimicrobianos, lo cual indica que son cepas multirresistentes, ya que en la mayoría de los casos reportaron resistencia a meticilina, correlacionándose con la presencia del gen *mecA*, el cual le confiere esta resistencia. Se describen cepas con susceptibilidad disminuida a vancomicina que es una de las opciones terapéuticas para las cepas SRM, es necesario un seguimiento de estas.

En la mayoría de los casos se reportan cepas SCC*mec* tipo I y tipo IV, quedando muchos SCN sin determinar el tipo de SCC*mec*, por lo que se recomienda realizar otra PCR que incluya los demás oligonucleótidos y secuenciar las bandas desconocidas que se repitieron en varias cepas.

SCC es un sistema estafilocócico de intercambio de información genética en general, que no está confinado solo al intercambio de genes de resistencia, sino que como se ha demostrado en las cepas tipo I, II y III, transportando genes para sobrevivir en ambientes hostiles por otras sustancias, produciendo la gran proteína plasmin sensitiva, ATPasa potasio dependiente y genes de resistencia a metales pesados, respectivamente (Ito *et al.*, 2001; Oliveira y de Lencastre, 2002). La detección de estos plásmidos no es crítica para la tipificación de la meticilino resistencia (Milheiriço *et al.*, 2007).

El elemento SCC*mec* es un marcador epidemiológico crítico para SARM y esto ha contribuido a la elucidación del origen y la historia evolutiva a nivel mundial de los clones SMR, sin embargo, no todas las cepas meticilino resistentes pueden ser tipificadas con los métodos disponibles por PCR, ya que existen todavía elementos SCC*mec* no identificados.

La PCR múltiple pone en evidencia varios aspectos: i) el *locus* D no está confinado a los tipos I, II o IV, ya que se ha demostrado estar también presente en el tipo III. ii) el tipo III es problemático de identificar, puesto que es un elemento compuesto, no obstante, la amplificación de los *loci* E y F es fundamental. iii) la tipificación del tipo II se complica cuando no todas las cepas transportan el operón *kdp*, pudiendo no ser clasificado como tipo II por las PCR múltiples descritas. iv) la tipificación de estos tipos debe estar basada en el complejo *mec*, *ccr* y regiones vecinas a estos complejos.

## CONCLUSIONES

La sensibilidad del disco de oxacilina y cefoxitina fue la misma para detectar la meticilino resistencia, con respecto, a la presencia del gen *mecA* en *S. aureus*, no así en SCN.

En el SAHUAPA, en Cumaná, estado Sucre, hay un predominio de cepas SARM SCC*mec* tipo I.

Las cepas *S. aureus* SCC*mec* tipo IV, aisladas en los pacientes ambulatorios y de emergencia adultos, pueden ser cepas comunitarias que se estén diseminando en los servicios hospitalarios como ya ha sido reportado en la literatura internacional y estar produciendo infecciones nosocomiales.

Las penicilinas resistentes a penicilinasas o antiestafilocócicas siguen siendo la primera opción terapéutica en las infecciones ocasionadas por *Staphylococcus* en los diferentes servicios del SAHUAPA.

El alto número de aislamientos de SCN de hemocultivos en la UN pudiese ser patognomónico de un brote infeccioso, conduciendo a una identificación a nivel de especie de dichas cepas para una mejor vigilancia epidemiológica de las infecciones en los neonatos, así como la detección del perfil de susceptibilidad.

## RECOMENDACIONES

Hibridar las cepas con bajo nivel de resistencia con sondas *mecl* y *meclR1*.

Utilizar otros oligonucleótidos para la caracterización del alelo *ccr*.

Para una mejor clasificación de las cepas *SCCmec* tipo IV, es conveniente utilizar los oligonucleótidos recomendados por Zhang *et al*, 2005 y Milheiriço *et al*, 2007.

Las cepas que no pudieron ser clasificadas por la PCR múltiple utilizada en este trabajo deben utilizarse los oligonucleótidos para los *SCCmec* tipos del IIA al IIE, IIIB.

Secuenciar las bandas desconocidas para saber a qué parte del elemento *SCCmec* corresponde.

Realizar un estudio de las cepas SAIV y posibles SARV para determinar su mecanismo de resistencia.

En la cepa 6 de SCN se recomienda hibridar con una sonda IS431.

Realizar electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) a las cepas de *Staphylococcus* para determinar la filogenia clonal.



## BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, M.; Velazco, E.; Nieves, B.; Mata, C.; Araque, M. y Gutiérrez, B. 2005. Caracterización fenotípica de *Staphylococcus coagulasa* negativa en una unidad de alto riesgo neonatal. *Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Sucre, XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología "Dr. Vidal Rodríguez Lemoine". Cumaná del 9 al 11 de Noviembre de 2005.*
- Adegoke, G. 1986. Comparative characteristics of *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus* and *Staphylococcus gallinarum* isolated from healthy and sick hosts. *Veterinary Microbiology*, 11: 185–189.
- Anderson, K. 2005. Is bacterial resistance to antibiotics an appropriate example of evolutionary change?. *Creation Research Society Quarterly*, 41: 318-326.
- Archer, G.; Niemeyer, D.; Thanassi, J. y Pucci, M. 1994. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 447–454.
- Baquero, F. 1997. Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39(A): 1-6.
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turk, M. 1966. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology*, 45: 493-496.
- Brumfitt, H. 1989. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The New England Journal of Medicine*, 320: 1188-1196.
- Bouza, E.; San Juan, R.; Muñoz, P.; Pascua, J.; Voss, A. y Desco, M. 2004. Cooperative Group European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). *Clinical Microbiology and Infections*, 10: 838-842.
- Cáceres, A.; Macero, C.; Guevara, R.; Guzmán, M. y Moreno, X. 2007. Estudio del perfil de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* en pacientes hospitalizados del Instituto Médico La Floresta, años 2001-2006. *Boletín Venezolano de Infectología*, 18(2): 51.
- Carmona, O. 1997. *Microbiología de Divo*. Quinta Edición. McGraw-Hill-Interamericana de Venezuela, S.A. Caracas, Venezuela.

- Center, K.; Reboli, A.; Hubler, R.; Rodgers, G y Long, S. 2003. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unity: evidence of spread of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4660-4665.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1997. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin—Japan, 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 46: 624–626.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2000. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—Illinois, 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 48: 1165–1167.
- CLSI. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing 16<sup>th</sup> ed., Vol. 26, N° 3. Approved standard M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- CLSI. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17<sup>th</sup> ed., Vol. 27 N° 1. Approved standard M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Couto, I.; de Lencastre, H., Severina, E.; Kloos, W.; Webster, J.; Hubner, R.; Santos, U. y Tomasz, A. 1996. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*, 2: 377–391.
- Cuevas, O.; Cercenado, E.; Vindel, A.; Guinea, J.; Sánchez-Conde, M.; Sánchez-Somolinos, M. y Bouza, E. 1999. Evolution of the microbial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 4240-4245.
- Daum, R.; Gupta, S.; Sabbagh, R. y Milewski, W. 1992. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *Journal Infectious Diseases*, 166: 1066–1072.
- De la Parte-Pérez, M.; Brito, A.; Landaeta, J.; Guzmán, M. y Carmona, O. 2003. Cambios en la resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antimicrobianos en centros clínicos del Área Metropolitana de Caracas, Venezuela. Período 1995-2002. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23: 190-195.
- Desroys du Roure, F.; Herrmann, J.; Lagrange, P. y Bouvet, A. 1993. Activité de la teicoplanine vis-à-vis des staphylocoques à coagulase négative (SCN) au sein des services hospitaliers de l'Hôtel-Dieu de Paris. *Pathologie et Biologie*, 41: 302–306.

- Dickinson, T. y Archer, G. 2000. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: role of *mecA* transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1616–1623.
- Dourado, A.; Alves, P.; Barbosa, L.; Viana-Niero, C.; Francisco, W.; Lottenberg, C.; Valle, M. y Höfling, A. 2007. Laboratory detection methods for methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections. 2007. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 70(4): 667-675.
- Dubín, D.; Matthews, P.; Chikramane, S. y Stewart, P. 1991. Physical mapping of the *mec* region of an American methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 1661-1665.
- Ena, J.; Dick, R.; Jones, R. y Wenzel, R. 1993. The epidemiology of intravenous vancomycin usage in a university hospital. A 10-year study. *JAMA*, 269: 598–602.
- Frigatto, E.; Machado, A.; Pignatari, A. y Gales, A. 2005. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci?. *Journal Clinical Microbiology*, 43: 2028–2029.
- Garrett, D.; Jochimsen, E.; Murfitt, K.; Hill, B.; McAllister, S.; Nelson, P.; Spera, R.; Sall, R.; Tenover, F.; Johnston, J.; Zimmer, B. y Jarvis, W. 1999. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infectious Control Hospital Epidemiology*, 20: 167–170.
- Gil, M. 2000. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a la meticilina. *Revista Chilena de Infectología*, 17: 145-152.
- Goldstein, F.; Coutrot, A.; Sieffer, A. y Acar, J. 1990. Percentages and distributions of teicoplanin- and vancomycin-resistant strains among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 34: 899–900.
- Hanaki, H.; Kuwahara-Arai, K.; Boyle-Vavra, S.; Daum, R.; Labischinski, H. y Hiramatsu, K. 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 199–209.
- Hanssen, A.; Kjeldsen, G. y Ericson, J. 2004. Local variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-

- negative staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer?. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 285–296.
- Hartman, B. y Tomasz, A. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 158: 513–516.
- Hébert, G.; Crowder, C.; Hancock, G.; Jarvis, W. y Thornsberry, C. 1988. Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the family *Micrococcaceae*. *Journal Clinical of Microbiology*, 26: 1939–1949.
- Hederstierna-Johnsen, T.; Schonheyder, H. y Paulsen, K. 2005. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by cefoxitin disk diffusion and oxacillin Etest. A study of consecutive bacteraemia isolates. *APMIS*, 113: 688–692).
- Hedin, G. y Widerström, M. 1998. Endocarditis due to *Staphylococcus sciuri*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17: 673–674.
- Hiramatsu, K.; Asada, K.; Suzuki, E.; Okonogi, K. y Yokota, T. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Letters*, 298: 133–136.
- Hiramatsu, K. 1995. Molecular evolution of MRSA. *Microbiology and Immunology*, 39: 531–543.
- Hiramatsu, K.; Kondo, N. y Ito, T. 1996. Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. *Journal Infectious and Chemotherapy*, 2: 117–129.
- Hiramatsu, K.; Hanaki, H.; Ino, T.; Yabuta, K.; Oguri, T. y Tenover, F. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 135–136.
- Hiramatsu, K. 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 1: 147–155.
- Hiramatsu, K.; Cui, L.; Kuroda, M. y Ito, T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiology*, 9: 486–493.
- Hiramatsu, K.; Katayama, Y.; Yuzawa, H. y Ito, T. 2002. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 292: 67–74.
- Horstkotte, M.; Knobloch J. y Rohde H. 2002. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci with the VITEK 2 system. *Journal Clinical Microbiology*, 40: 3291–3295.

- Huesca, M.; Peralta, R.; Sauder, D.; Simor, A. y McGavin, M. 2002. Adhesion and virulence properties of epidemic Canadian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain 1: identification of novel adhesion functions associated with plasmin-sensitive surface protein. *Journal Infectious Diseases*, 185: 1285–1296.
- Hussain, Z.; Stoakes L. y Massey, V. 2000. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *Journal Clinical Microbiology*, 38: 752–754.
- Ito, T.; Katayama, Y. y Hiramatsu, K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1449–1458.
- Ito, T.; Katayama, Y.; Asada, K.; Mori, N.; Tsutsumimoto, K.; Tiensasitorn, C. y Hiramatsu, K. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:1323-1336.
- Ito, T.; Ma, X.; Takeuchi, F.; Okuma, K.; Yuzawa, H. y Hiramatsu, K. 2004. Novel type V *Staphylococcus* cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 2637-2651.
- Jevons, M. 1961. “Celbenin”- resistant staphylococci. *Britanical Medical Journal*, 1: 124-125.
- Johnson, A. y Woodford, N. 2002. Glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 621–623.
- Josefsson, E., Juuti, K., Bokarewa, M. y Kuusela, P. 2005. The surface protein PIs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in septic arthritis. *Infection and Immunity*, 73: 2812-2817.
- Juuti, K.; Ibrahim, S.; Virolainen-Julkunen, A.; Vuopio-Varkila, J. y Kuusela. P. 2005. The *pls* Gene Found in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Is Common in Clinical Isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3): 1415–1419.
- Kacica, M. y McDonald, L. 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. New York, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 53: 322–323.
- Katayama, Y.; Ito, T. y Hiramatsu, K. 2001. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* gene in staphylococcal clinical strains: a role of IS431-mediated *mecI* deletion in the resistance expression of *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1955–1963.

- Katayama, Y.; Takeuchi, F.; Ito, T.; Ma, X.; Mizutani, Y.; Kobayashi, I. y Hiramatsu, K. 2003. Identification in methicillin – susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome mec of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 185: 2711-2722.
- Kloos, W.; Schleifer, K. y Smith, R. 1976. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26: 22–37.
- Kloss, W. y Bannerman, T. 1994. Update on Clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology*, 7: 117-140.
- Kloos, W.; Ballard, D.; Webster, J.; Hubner, R.; Tomasz, A.; Couto, I.; Sloan, G.; Dehart, H.; Fiedler, F.; Schubert, K.; de Lencastre, H.; Santos, I.; Heath, H.; Leblanc, P. y Ljungh, A. 1997. Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 313–323.
- Kolawole, D. y Shittu, A. 1997. Unusual recovery of animal staphylococci from septic wounds of hospital patients in Ile-Ife, Nigeria. *Letters Applied of Microbiology*, 24: 87–90.
- Lim, T.; Coombs, G. y Grubb, W. 2002. Genetic organization of *mecA* regulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 819-824.
- Losada, I.; Moure, R. y Freire, M. 2003. Artritis séptica recidivante por *Staphylococcus lugdunensis* sobre prótesis de rodilla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21: 214.
- Lozada, R. 2004. Detección de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina en infecciones nosocomiales y comunitarias. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Luong, T.; Ouyang, S. y Lee, Y. 2002. Type I capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *Journal of Bacteriology*, 184: 3623-3629.
- Ma, X.; Ito, T.; Tiensasitorn, C.; Jamklang, M.; Chongtrakool, P.; Boyle-Vavra, S.; Daum, R. y Hiramatsu, K. 2002. Novel type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1147–1152.

- Macero, C. y Moreno, X. 2007 a. Impacto del sistema automatizado bacted-bd en la detección de hemocultivos positivos. Instituto Médico La Floresta. *Boletín Venezolano de Infectología*, 18(2): 76.
- Macero, C. y Moreno, X. 2007 b. Caracterización fenotípica del mecanismo de resistencia a macrólidos y lincosamidas en *Staphylococcus aureus* y su importancia clínica. Instituto Médico La Floresta. *Boletín Venezolano de Infectología*, 18(2): 76.
- McKenzie, T.; Hoshino, T.; Tanaka, T. y Sueoka, N. 1986. The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid*, 15: 93-103.
- Madigan, M.; Martinka, J. y Parker, J. 2004. *Biología de los microorganismos*. Décima Edición. Prentice-Hall International. Madrid, España.
- Mata, G. 2003. Serotipificación y susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aisladas en pacientes con cuadro febril reclusos en el SAHUAPA, Cumaná, Estado Sucre. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Mahillon, J.; Leonard, C. y Chandler, M. 1999. IS elements as constituents of bacterial genomes. *Research Microbiology*, 150: 675-687.
- Matthews, P. y Tomasz, A. 1990. Insertional inactivation of the *mec* gene in a transposon mutant of a methicillin-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34: 1777-1779.
- McGeachie, D. y Daley, D. 2000. 9th International Symposium of Staphylococci and Staphylococcal Infections, abstract no. 13.
- Milheiro, C.; Oliveira, D. y de Lencastre, H. 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9): 3374-3377.
- Miller, D.; Urdaneta, V.; Weltman, A. y Park, S. 2002. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 51: 902.
- Mongkolrattanothai, K.; Boyle, S.; Murphy, T. y Daum, R. 2004. Novel non-*mecA*-containing Staphylococcal Chromosomal Cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal Staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1823-1836.
- Morales, M.; Bolívar, Y.; Fandiño, C.; Gonzáles, I.; Valenzuela, P.; Sánchez, M.; Comegna, M.; Cortesía, M.; Rodríguez, J.; Correa, D.; Poleo, V. y Guzmán, M. 2007. Patrones de resistencia de

- Staphylococcus aureus* aislados en el Hospital Vargas de Caracas, Enero-Agosto 2007. Alerta epidemiológica. 2007. *Boletín Venezolano de Infectología*, 18(2): 54.
- Murakami, K.; Minamide, W.; Wada, K.; Nakaruma, E.; Teraoka, H. y Watanabe, S. 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal Clinical of Microbiology*, 29: 2240–2244.
- Nakipoglu, Y.; Derbentli, S.; Cagatay, A. y Katranci, H. 2005. Investigation of *Staphylococcus* strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish university hospital. *Biomedcentral Infectious Diseases*, 5: 31-39.
- NCCLS. 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard-6th edition. M11-A6. NCCLS, Wayne, PA.
- Oliveira, D.; Tomasz, D. y de Lencastre, H. 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microbiology Drug Resistant*, 7: 349–361.
- Oliveira, D. y de Lencastre, H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2155-2166.
- Oliveira, D.; Milheiriço, C. y de Lencastre, H. 2006. Redefining a structural variant of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCC*mec* Type VI. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 3457-3459.
- Perazzi, B.; Rodríguez, M.; Malimovka, A.; García, M.; Orgambide, M.; Vay, C.; de Torres, R. y Famiglietti, A. 2006. Accuracy of cefoxitin Disk testing for characterization of oxacillin resistance mediated by penicillin-binding protein 2a in coagulase-negative Staphylococci. *Journal Clinical of Microbiology*, 44(10): 3634–3639.
- Pottumarthy, S.; Fritsche, T. y Jones, R. 2004. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting *mecA*-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, 51: 57–62.
- Prescott, L.; Harley, L. y Klein, D. 2002. *Microbiología*. Quinta Edición. McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, España.
- Pucci, M. y Dougherty, T. 2002. Direct quantitation of the numbers of individual penicillin-binding proteins per cell in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 182: 588-591.



- Raz, R.; Colodner, R. y Kunin, C. 2005. Who Are You—*Staphylococcus saprophyticus*? *Clinical Infectious Diseases*, 40: 896–898.
- Requena, I.; Abufakredin, R.; Azócar, M.; Abufakredin, M.; Padrón, A.; Pérez, D. y Mata, J. 2005. Portador nasal de *Staphylococcus aureus*. Servicio de traumatología, complejo universitario “Ruiz y Páez”. Ciudad Bolívar, estado Bolívar. *Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Sucre, XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología "Dr. Vidal Rodríguez Lemoine"* .Cumaná del 9 al 11 de Noviembre de 2005.
- Salazar, S. 2003. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en individuos con furunculosis. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Salvemini, F. 2003. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo en manipuladores de alimentos de Cumaná estado Sucre. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela..
- Schaeffler, S.; Jones, D.; Perry, W.; Ruvinskaya, L.; Baradet, T. y Mayr, E. 1981. Emergence of gentamicin- and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in New York City hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 13: 754-759.
- Schwalbe, R.; Stapleton, J. y Gilligan, P. 1987. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *New England Journal of Medicine* 316: 927–931.
- Serrano, N.; Velásquez, E.; Sánchez, D.; Solórzano, E. y Urrestarazu, M. 2007. Resistencia a clindamicina de *Staphylococcus aureus* aislados de infecciones de piel y tejidos blandos. Instituto de Biomedicina. Caracas – Venezuela. *Boletín Venezolano de Infectología*, 18(2): 75.
- Shore, A.; Rossney, A.; Keane, C.; Enright, M. y Coleman, D. 2005. Seven Novel Variants of the Staphylococcal Chromosomal Cassette *mec* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Ireland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(59): 2070–2083.
- Sieradzki, K.; Villari, P. y Tomasz, A. 1998. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 100–107.
- Sieradzki, K.; Wu, S. y Tomasz, A. 1999. Inactivation of the methicillin resistance gene *mecA* in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*, 5: 253–257.
- Sievert, D.; Boulton, M.; Stolman, G.; Johnson, D.; Stobierski, M.; Downes, F.; Somsel, P.; Rudrik, J.; Brown, W.; Hafeez, W.; Lundstrom, T.; Flanagan, E.; Johnson, R.; Mitchell, J. y Chang, S. 2002.

- Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 51: 565–567.
- Skinner, S.; Ingli, B.; Matthews, P. y Stewart, P. 1988. Mercury and tetracycline resistance genes and flanking repeats associated with methicillin resistance on the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2: 289-298.
- Smith, T; Pearson, M.; Wilcox, K.; Cruz, C.; Lancaster, M.; Robinson-Dunn, B.; Tenover, F.; Zervos, M.; Band, J.; White, E. y Jarvis, W. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. *New England Journal Medicine*, 340: 493–501.
- Spink, F. 1945. Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of *Staphylococci*. *Science*, 102(2644): 221-223.
- Suzuki, E.; Hiramatsu, K. y Yokota, T. 1992. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36: 429–434.
- Suzuki, E.; Kuwahara-Arai, K.; Richardson, J. y Hiramatsu, K. 1993. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 1219–1226.
- Tedesco, R.; Porras, V.; Ramírez, Y.; Requena, I.; Padrón, A.; Pérez, D. y Mata, J. 2005. Epidemiología de los portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en pacientes dializados y personal de la unidad de hemodiálisis estado Bolívar. *Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Sucre, XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología "Dr. Vidal Rodríguez Lemoine". Cumaná del 9 al 11 de Noviembre de 2005.*
- Tee, S. y Lim, S. 2003. *Staphylococcus lugdunensis* carrying the *mecA* gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate. *Journal Clinical Microbiology*, 41: 519–20.
- Tenover, F. 1999. Implications of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Hospital Infectious*, 43(Suppl.): S3–S7.
- Tenover, F.; Biddle, J. y Lancaster, M. 2001. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 327–332.
- Tenover, F.; Weigel, L.; Appelbaum, P.; McDougal, L.; Chaitram, J.; McAllister, S.; Clark, N.; Killgore, G.; O'Hara, C.; Jevitt, L.; Patel, J. y Bozdogan, B. 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus*

*aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 275–280.

- Tomasz, A.; Drugeon, H.; De Lencastre, H.; Mc Dougall, L. y Bille, J. 1989. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 1869-1874.
- Tomasz, A.; Nachman, S. y Leaf, H. 1991. Stable classes of phenotypic expression in methicillin resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 35: 124-129.
- Torres, L.; Calvo, A.; Colmenares, J.; Rodríguez, N. y Pedroza, R. 2005. Detección fenotípica y molecular de la B-lactámico resistencia en cepas de *Staphylococcus aureus*. *Boletín Venezolano de Infectología*, 16: 70.
- Udo, E.; Jacob, L. y Chugh, T. 1995. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from a Kuwait hospital. *Microbial Drug Resistance*, 1: 315–320.
- Veach, L.; Pfaller, M.; Barrett, M.; Koontz, F. y Wenzel, R. 1990. Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 2064–2068.
- Velasco, E.; Nieves, B.; Vindel, A.; Araque, M.; Alviarez, E.; Humbria, L.; Gonzalez, N.; Gutierrez, B. y Bianchi, G. 2005. Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en una unidad de alto riesgo neonatal. 2005. *Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Sucre, XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología "Dr. Vidal Rodríguez Lemoine." Cumaná del 9 al 11 de Noviembre de 2005.* Versión digitalizada.
- Villarreal, R.; Urich, J.; Valdez, N.; Mayorca, B. y Tejada, Z. 1979. Análisis de la susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* a varios antibióticos en menores de 14 años en el período Enero 1978- Abril 1979. Hospital Universitario Ruíz y Paez. Ciudad Bolívar. Trabajo de pregrado. Escuela de Medicina, Universidad de Oriente. Ciudad Bolívar, Venezuela.
- Vivas, R.; Perozo-Mena, A.; Castellano-González, M.; López, M.; López, E.; Núñez, A y Amesty, A. 2005. Resistencia a linezolid, quinipristin-dalfopristin y telitromicina en cepas de *Staphylococcus aureus* intrahospitalarias. *Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Sucre, XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología "Dr. Vidal Rodríguez Lemoine". Cumaná del 9 al 11 de Noviembre de 2005.*

- Weigel, L.; Clewell, D.; Gill, S.; Clark, N.; McDougal, L; Flannagan, S.; Kolonay, J.; Shetty, J.; Killgore, G. y Tenover, F. 2003 Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, 302: 1569–1571.
- Wielders, C.; Box, A.; Verhoef, J. y Fluit, A. 2003. 103<sup>rd</sup> Genetic Meeting of American Society of Microbiology, abstr. A-068
- Wu, S.; Piscitelli, C.; de Lencastre, H. y Tomasz, A. 1996. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microbiology Drug Resistance*, 2: 435–441.
- Zhang, K.; McClure, J.; Lowie, T. y Conly, J. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10): 5026-5033.

# **Hoja de Metadatos**

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE <i>Staphylococcus</i> METICILINO RESISTENTES AISLADAS EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA DEL SERVICIO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO “Antonio Patricio de Alcalá” DE CUMANÁ</b>
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Acuña R., Saraí del V.</b>	<b>CVLAC</b>	<b>16.816.846</b>
	<b>e-mail</b>	<b>svar84@hotmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

### Palabras o frases claves:

<b><i>Staphylococcus</i>, resistencia, meticilina</b>

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

## Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencia	Biología
	Biotecnología

## Resumen (abstract):

Para la caracterización molecular de las cepas de *Staphylococcus* meticilino resistente (SMR), se colectaron 59 cepas SMR aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA, en un período de siete meses (enero a julio 2007). Se obtuvieron 50 cepas resistentes a meticilina, sin duplicado, 21 *S. aureus* y 29 *Staphylococcus* coagulasa positiva (SCN). Se les realizó perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos, PCR múltiple, a las cepas positivas para *mecA*, se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). *S. aureus* reportó 20 cepas resistentes a oxacilina y cefoxitina y 27 cepas de SCN resistentes a oxacilina y a cefoxitina, correlacionándose la presencia del gen *mecA* con el número de cepas resistentes a oxacilina y a cefoxitina solo en *S. aureus*; algunas discordancias fueron observadas en cepas de SCN, presentó una cepa sensible a oxacilina y cefoxitina, con *mecA* positivo y 7 cepas que reportaban resistencia a meticilina pero con ausencia del gen *mecA*. En el caso de las cepas de *Staphylococcus* que fueron resistentes a meticilina, pero sin gen *mecA*, resultaron ser cepas hiperproductoras de betalactamasas o con PBP constitutivas mutadas. Las cepas de *Staphylococcus* presentaron multirresistencia a eritromicina, clindamicina y susceptibilidad intermedia a teicoplanina y vancomicina y una cepa de *S. aureus* resultó resistentes a vancomicina. La mayoría de *Staphylococcus* se ubicaron como SCC*mec* tipo I y IV, siendo el primero el clon arcaico y el IV el clon comunitario, sin embargo, en pocos casos de *S. aureus* y en la mayoría de los SCN no se logró determinar, necesiéndose otros oligonucleótidos para determinar los subtipos de los SCC*mec*. Las cepas que presentaron gen *mecA*, para la CMI a oxacilina, las cepas 1-8, 11, 13 y 17 de *S. aureus* y las 5, 10, 11, 16, 18, 27 y 28 se ubicaron en clase 4 con homorresistencia; las cepas 9, 14, 15, 16, 18, 19 y 20 de *S. aureus* y 4, 9 y 19 SCN se ubicaron en clase 3 con heterorresistencia con altos niveles de resistencia; las cepas 3, 15 y 29 de SCN en clase 2 heterorresistentes; mientras que la 21 de *S. aureus* y las 1, 3, 6, 7, 14, 20, 22, 24 y 26 en clase 1 heterorresistentes pero con bajo niveles de resistencia. Las penicilinas resistentes a penicilinasas siguen siendo la primera opción terapéutica en las infecciones ocasionadas por *Staphylococcus* en los diferentes servicios del SAHUAPA, porque el porcentaje de cepas SMR no fue tan elevado.

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

## Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Abadía P., Lorena	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	abalor@movistar.com
	e-mail	
Guzmán, Militza	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	miltzaguz@cantv.net
	e-mail	
Sánchez, Elia	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	eliasanchezo@gmail.com
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

## Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2008	09	26

Lenguaje: Spa



# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-sarai.doc	Word

Alcance:

Espacial : Universal (Opcional)  
Temporal: 2013 (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio:

BIOLOGÍA

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente Núcleo de Sucre

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

## Derechos:

Los resultados obtenidos de este estudio aún no han sido publicados, por tanto sólo se otorga el derecho de mostrar el resumen del mismo públicamente

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

