



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS
DE HIDALGO**

ESCUELA DE QUIMICOFARMACOBIOLOGIA

TESIS:

**“AUSENCIA DEL CASSETTE DE RESISTENCIA A METICILINA *SCCmec* DE
Staphylococcus. aureus EN AISLAMIENTOS DE ORIGEN DE BOVINOS.”**

PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICOFARMACOBIOLOGO

PRESENTADO POR:

p.Q.F.B . JOSE GERARDO BARRAGAN IXTA

ASESOR DE TESIS:

DR. JUAN JOSE VALDEZ ALARCON

MORELIA, MICHOACAN OCTUBRE 2010



INDICE.

Introducción.....	1
1.1.-Infecciones causadas por <i>S. aureus</i>	3
1.2.- Infecciones adquiridas en la comunidad.....	4
1.3.-Infecciones Intrahospitalarias (nosocomiales).....	6
1.4.-Mastitis Bovina.....	8
2.- Antecedentes.....	11
2.1.- Antecedentes en el laboratorio.....	12
2.2.- Clasificación: MRSA (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina), MSSA (<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina).....	15
2.3.-Resistencia a antibióticos.....	16
2.4.-Genómica de <i>S. aureus</i>	20
2.5.-Gen <i>mecA</i>	20
2.6.-Casete Cromosómico de <i>Staphylococcus mec</i> (SCCmec) tipos de <i>ccrAB</i>	22
3.- Estándares de CLSI.....	26
4.-Hipótesis.....	28
5.-Objetivo.....	28
5.1.-Objetivo general.....	28
5.2.-Objetivo específicos.....	28
6.- Materiales y Métodos.....	28
6.1.-Bacterias.....	28
6.2.-Realización del Antibiograma de Acuerdo a los Criterios de CLSI de los Aislamientos de Origen Bovino y Humano de <i>S. aureus</i>	29
6.3.-Inoculación de las Placas de agar MH.....	29
6.4.-Extracción de ADN.....	32
6.5.- Concentración y estimación de la pureza del ADN por espectrofotometría.....	32
6.6.-PCR con los oligos <i>mecAp4</i> y <i>mecAp7</i> para la amplificación del gen <i>mecA</i> para la determinación de resistencia a meticilina.....	33

6.7.-PCR con los oligos ccrAF1, ccrAR1, ccrBF1, y ccrBR1 para la amplificación de los genes del complejo de <i>ccrAB</i>	34
6.8.-PCR con los oligos 1517-R y 1095-F para amplificación de la región polimórfica X del gen de la Proteína A membranal.....	35
7.-Resultados.....	35
8.-Discusión.....	48
9.- Conclusiones.....	51
10.- Bibliografía.....	52

INDICE DE FIGURAS

Figura No.1.- Figura No.3.- Integración de los análisis por PFGE, MLST y polimorfismo de los genes <i>coa</i> y <i>spa</i> . ST, Secuenciotipo; <i>coa</i> , variantes de <i>coa</i> ; <i>spa</i> , variantes de <i>spa</i> ; ND, no determinado. (Tomado del artículo de epidemiología molecular de la mastitis bovina causada por <i>S. aureus</i> en granjas familiares en las poblaciones de Cotzio y Tejáro, Michoacán. Valdez-Alarcón y col.2009).....	13
Figura No.2.- Árbol filogenético realizado con el programa mega4, con las secuencias de un tamaño de 204 pb. (Tomado de la tesis de Elizabeth Granados Beltrán. 2009).....	14
Figura No.3.- Mecanismos de acción de algunos agentes antimicrobianos. (Tomado de manual de susceptibilidad antimicrobiana de Cavalieri y col, 2005).....	18
Figura No.4.- Representación del genoma de la cepa SARM 252 donde se muestra de color amarillo los core genes de rojo los genes Core Variable (CV) y de purpura los elementos genéticos móviles (MGE). (Tomado de Lindsay y col, 2006).....	20
Figura No.5.- Figura No. 7: Molécula de penicilina con el anillo β -lactámico. (Tomado de manual de susceptibilidad antimicrobiana de Cavalieri y col, 2005).....	21
Figura No.6.- Figura No.8.- Blanco de acción de un β -lactámico. (Tomado de manual de susceptibilidad antimicrobiana de Cavalieri y col, 2005).....	21

Figura No.7.- Estructura de la presencia de terminales invertidas y directas repetidas, <i>ccr</i> y complejo <i>mecA</i> en <i>SCCmec</i> . (Tomado de Katayama y col, 2000).....	23
Figura No.8.- Estructura de los <i>SCCmec</i> . Se indican las regiones de los complejos <i>ccr</i> , <i>mec</i> y las regiones junkyard. (Tomado de Ito y col, 2009).....	25
Figura No.9. Colonias blanco-grisáceas β -hemolíticas típicas de <i>S. aureus</i> de los aislados de mastitis bovina en las comunidades de Cotzío y Tejáro.....	36
Figura No.10.- Colonias de color rosa típicas de <i>S. aureus</i> de los aislados de mastitis bovina en el medio CHROMAgar TM	36
Figura No.11.- Sensibilidad del disco de cefoxitina (30 μ g) que nos indica la ausencia del gen <i>mecA</i> del aislado MRI-32 de <i>S. aureus</i> , nótese la resistencia a ampicilina.....	42
Figura No.12.- Resistencia a penicilina y a tetraciclina del aislado MRI-32 de <i>S. aureus</i> nótese los pequeños halos de inhibición.....	42
Figura No.13.- Resistencia a ampicilina del aislado MRI-32 de <i>S. aureus</i> nótese el pequeño halo de inhibición.....	42
Figura No.14.- Resistencia a cefalotina, clindamicina y a penicilina del aislado MRI-147 de <i>S. aureus</i> nótese los pequeños halos en el Cefalotina y la Penicilina y ausencia del halo en clindamicina.	43
Figura No.15.- Resistencia a cefalotina de la cepa MRI-151 de la nueva especie del género <i>Staphylococcus</i> nótese el pequeño halo de inhibición..	43
Figura No.16.- Resistencia a cloranfenicol del aislado de cepa clínica de Osteomielitis de <i>S. aureus</i>	43
Figura No.17.- Extracción de DNA utilizando SDS y Proteinasa K, lisozima, lisostafina y RNAasa. Se observa DNA de alto peso molecular y plásmidos sin la presencia de ribonucleasas.	45
Figura No.18.- Extracción de DNA utilizando SDS y Proteinasa K, lisozima, lisostafina sin tratamiento con RNAasa. Se observa DNA de alto peso molecular y plásmidos con la presencia de ribonucleasas.....	45

Figura No.19.- Ausencia del gen <i>mecA</i> y del cassette <i>SCCmec</i> y de las recombinasas del <i>ccrAB</i> de los aislados de mastitis bovina de las comunidades de Cotzio y Tejáro no se observan productos de PCR puesto que en el antibiograma son sensibles a meticilina.....	46
Figura No.20.- Se muestra la amplificación de los oligos <i>mecAp4</i> y <i>mecAp7</i> donde se muestra el gen <i>mecA</i> como producto amplificado de PCR.....	47
Figura No.21.- Amplificación de la región X del gen de la proteína A membranal de <i>S. aureus</i> de los aislados de bovinos nótese un doble producto de un gen que corresponde a un pseudogen y obsérvese los productos de PCR que corresponden a la proteína A.....	48
Cuadro No. 1.- Principales factores de virulencia de <i>S. aureus</i> (Tomado de Bustos-Martínez).....	3
Cuadro No. 2.- Principales características y diferencias entre las cepas SARM-AH y SARM-AC y cepas asociadas a animales. Tomado de Bustos y col., (2006); David (2008); Diep y Otto (2008); Gordon y Lowy (2008); Sung y col. (2008); van Loo y col. (2007).....	4
Cuadro No.3.- Mecanismos de resistencia identificados en <i>S. aureus</i> . (Tomado de Velázquez Meza, 2005).....	19
Cuadro No. 4: Evolución de la resistencia a meticilina en el CC8. (Tomado de Robinson y col, 2004).....	22
Cuadro No.5.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>mecA</i>	33
Cuadro No.6.- Oligonucleótidos que se utilizan para la amplificación de los genes del complejo <i>ccrAB</i>	34
Cuadro NO.7.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen de la región X polimórfica de la proteína A (<i>spa</i>).	35
Cuadro No.8.- Grupo de antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones producidas por <i>S. aureus</i> en bovinos. Estos antibióticos se utilizaron para las pruebas de susceptibilidad de acuerdo a los criterios del CLSI.....	38
Cuadro No.9.- Resultados de la resistencia de los aislamientos de <i>S. aureus</i> de las comunidades de Cotzio y Tejáro Michoacán.	38
Cuadro No.10.- Concentración Mínima inhibitoria de meticilina de los aislamientos de <i>S. aureus</i> de origen bovino de las comunidades de Cotzio y Tejáro.....	40
Cuadro No.11.- Determinación de concentración y pureza del ADN.....	44

Grafica No.1: Resultados globales obtenidos de mastitis bovina en granjas familiares de la región de Cotzío y Tégaro Michoacán (Imagen tomada de la Tesis de Elizabeth Granados Beltrán, 2009).....11

Grafica No.2: Este gráfico representa la incidencia de las resistencias mas frecuentes de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino de las comunidades de Cotzío y Tégaro.....41

AUSENCIA DEL CASSETTE DE RESISTENCIA A METICILINA *SCCmec* DE *Staphylococcus aureus* EN AISLAMIENTOS DE ORIGEN BOVINO.

RESUMEN:

Staphylococcus aureus es un patógeno que produce infecciones localizadas en piel, intoxicaciones o infecciones intrahospitalarias como la osteomielitis y la endocarditis. Puede causar infecciones en heridas, lesiones postoperatorias y mastitis en animales de granja y compañía. Se estudia la homogeneidad genética de las cepas de aislados de bovinos y de un aislado de cepa clínica de humanos de osteomielitis, en nuestro laboratorio describimos que las poblaciones del ST97 (origen bovino) y ST8(origen humano) comparten el mismo nicho ecológico y que representa una fuente potencial de transferencia de genes de virulencia, patogenicidad y resistencia a antibióticos y de una nueva especie del genero *Staphylococcus* que presenta multidrogoresistencia y ausencia del gen *mecA* (MRI-151) sensible a meticilina. Se realizo antibiograma de acuerdo a los criterios del CLSI (antes NCCLS) utilizando el antibiótico cefoxitina (FOX 30µg) que detecta la resistencia mediada por el gen *mecA* en vez de oxacilina (OX 1µg) tanto a las cepas de aislados de bovinos que son ST8 y ST97 de MRI-151 y la de aislado de osteomielitis de humanos siendo sensibles a meticilina, presentando resistencia a otros antibióticos. En este estudio demostramos que los ST8 (resistentes a meticilina según lo reportado en la literatura) son sensibles a meticilina por lo que todavía las cepas no expresan el gen *mecA* lo cual nos indica la ausencia del cassette *SCCmec* y por ende no presentan los genes de las recombinasas del complejo *ccrAB* que son genes móviles que le dan la movilidad para el gen de resistencia a meticilina gen *mecA* cuyos genes se han encontrado tanto en los ST97 de origen bovino y en ST8 derivada de cepas patógenas de humanos.

Palabras clave: *S. aureus*, ST8 y ST97, MRI-151, CLSI, cefoxitina, oxacilina, meticilina, gen *mecA*, cassette *SCCmec*, recombinasas del *ccrAB*.

AUSENCIA DEL CASSETTE DE RESISTENCIA A METICILINA *SCCmec* DE *Staphylococcus aureus* EN AISLAMIENTOS DE ORIGEN DE BOVINOS.

1.-INTRODUCCION:

El nombre estafilococos fue designado por Sir. Alexander Ogston después de utilizar la raíz griega *staphyle* (racimos de uvas) para describir la característica de crecimiento en grupos semejantes a uvas. Los estafilococos son cocos Gram positivos que miden cerca de 1 μm de diámetro, no móviles, aerobios facultativos y fermentadores de glucosa. El género *staphylococcus* contiene más de 30 especies diferentes, y muchos de estas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas. No suelen encontrarse en otros hábitats importantes, como tejidos u órganos; excepto cuando están involucradas en infecciones. Los estafilococos crecen en medios químicamente definidos, los cuales contienen glucosa, sales, aminoácidos, tiamina y ácido nicotínico. En medios suplementados, los estafilococos crecen bien en rangos de pH de 4.8 a 9.4 y a temperaturas de 25 a 43°C. El color amarillo clásico de las colonias de *S. aureus* se debe a la producción de carotenoides. Sin embargo, frecuentemente se presentan variantes no pigmentadas en muchas cepas (Velázquez Meza, 2005). En la patogénesis por *S. aureus* participan diversos factores celulares:

- 1) Estructurales de la superficie y relacionados con la formación de biopelículas (peptidoglicano, polisacáridos capsulares, proteínas estructurales, ácidos teicoicos, proteína A, proteína asociada a biopelículas, proteína de adhesión a polisacárido).
- 2) Adhesinas (factor de unión a fibrinógeno, factores de unión a fibronectina, proteína de unión a colágeno, proteína de unión a elastina, factores de agregación).
- 3) Enzimas (coagulasa, catalasa, hialuronidasa, colagenasa, proteasa V8, nucleasas, fosfolipasa, estafilocinasa).

- 4) Toxinas (enterotoxinas, toxinas exfoliativas, toxina de choque tóxico, hemolisinas, $\alpha, \beta, \delta, \gamma$, leucocidina Pantón-Valentine o PVL, leucocidinas y leucotoxinas) (Cheung, 2001; Dinges et al., 200; Götz, 2002).

El surgimiento de técnicas de secuenciación de alta densidad ha permitido el análisis comparativo del genoma de aislamientos bacterianos de especies de interés en salud pública, provenientes de diferentes hospederos, procesos patológicos o regiones geográficas. Mediante el análisis de la sintenia, ha sido posible encontrar diferencias en la estructura, distribución y secuencia de islas de patogenicidad, islas genómicas, elementos genéticos móviles (profagos, transposones, plásmidos crípticos) y de genes en particular. Con datos derivados de la transcriptómica y la proteómica, ha sido posible identificar grupos de genes cuya estructura y expresión es diferencial en cepas aisladas de fuentes diferentes. *S. aureus* es un patógeno que produce diversos cuadros patológicos en humanos y en animales. En ambos casos, puede encontrarse asociado a infecciones de la piel, de vías respiratorias, intoxicaciones alimentarias, e infecciones nosocomiales (intra-hospitalarias en humanos, adquiridas en quirófano en caballo y animales de compañía). Análisis genómicos en estas cepas han revelado diferencias estructurales y de expresión en genes de virulencia. Por ejemplo, la presencia o ausencia de las toxinas (la leucocidina Pantón-Valentine, hemolisinas, etc), entre cepas de origen humano o bovino, o entre diferencias patológicas en humanos. El gen que codifica para la proteína A parece ser un pseudogen en algunos aislamientos de bovinos, lo cual sugiere que posiblemente no participe del proceso patológico. También se han identificado genes que se expresan, diferencialmente en portadores nasales. La genómica comparativa ha puesto de manifiesto diferencias estructurales (polimorfismos) en los genes de virulencia, particularmente en proteínas de la superficie microbiana y en toxinas. Actualmente solo se cuenta con nueve genomas totalmente anotados de *S. aureus* (de ellos uno es de origen animal), lo cual no provee suficiente información para establecer correlaciones entre estos polimorfismos y el tipo de hospedero o de patología a la que se asocian (Valdez-Alarcón et al. 2009).

Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglucano	Catalasa	Toxina α (Hemolisina α)
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina β
Factores de adhesión	Lipasas	Hemolisina γ
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Hemolisina δ
Polisacáridos capsulares	Nucleasas	Leucocidina de Pantón-Valentín (PVL)
	Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas(SE)
	Estafilocinasa	Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)
	Colagenasa	Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)

Cuadro 1: Principales factores de virulencia de *S. aureus* (Tomado de Bustos-Martínez).

1.1.-Infecciones causadas por *S. aureus*.

De acuerdo a su origen, se reconocen dos tipos de infecciones causadas por *S. aureus*. Aquellas infecciones adquiridas por estancias prolongadas en un hospital o por procedimientos realizados en hospitales (procedimientos prequirúrgicos, cirugías, cateterizaciones, colocación de implantes o prótesis), se les designa como “adquiridas en hospital” (AH) o nosocomiales. Las infecciones por *S. aureus* que se adquirieron fuera de hospitales o de procedimientos asociados a ellos, se denominan “adquiridas en la comunidad” (AC). Las cepas asociadas a infecciones AH se caracterizan por multirresistencia a antibióticos, *SCCmec* tipos I, II y III (el *SCCmec* es el cassette de resistencia a meticilina y se comentara con más detalle en la sección 2.6) presentan varias toxinas, la diversidad de procesos infecciosos en los que participan es alta, generalmente se relacionan genéticamente con las clonas Ibérica, Brasileña, Húngara, Nueva York/Japón o Pediátrica. En cambio, las cepas asociados a infecciones AC suelen presentar exclusivamente resistencia a

β -lactámicos y eritromicina, contener los tipos de *SCCmec* IV y V, predomina la toxina PVL, los cuadros infecciosos son limitados (piel, tejidos blandos, neumonía necrotizante, septicemia) y se asocian principalmente con las clonas USA 300 y USA 400 (Bustos-Martínez et al., 2006).

Cepas SARM hospitalarias (SARM-AH).	Cepas SARM adquiridas en la comunidad (SARM-AC).	Cepas asociadas a animales.
Multiresistencia a antibióticos.	Resistencia a β -lactámicos/eritromicina.	Multiresistencia a antibióticos.
<i>SCCmec</i> , I, II y III.	<i>SCCmec</i> IV y V.	<i>mecA</i> , <i>SCCmec</i> II, III, IV, V (todos en animales sanos).
Toxinas diversas, enzimas hidrolíticas.	Leucocidina Pantón-Valentín.	Leucocidina Pantón-Valentín (no PVL en Brasil).
Infecciones nosocomiales.	Infecciones piel, tejidos blandos, neumonía necrotizante, septicemia, intoxicaciones.	Mastitis, piodermas, intervenciones quirúrgicas (equinos, perros, gatos).
5 clonas pandémicas (Ibérica, Brasileña, Húngara, Nueva York/Japón y Pediátrica).	2 clonas pandémicas (USA 300 y USA 400).	CC o ST asociados a especie o región.
CC5 (ST5), ST22, ST36, ST45.	CC30 (ST30), CC8 (ST8).	CC97, CC151, CC130, CC188, ST5 (bovinos), CC398, ST9 (cerdos), CC8- ST239, ST22 (perros, gatos, exóticos), CC1, CC8, CC22, CC873 (equinos).

Cuadro 2: Principales características y diferencias entre las cepas SARM-AH y SARM-AC y cepas asociadas a animales. Tomado de Bustos y col., (2006); David (2008); Diep y Otto (2008); Gordon y Lowy (2008); Sung y col. (2008); van Loo y col. (2007).

1.2.- Infecciones adquiridas en la comunidad.

Hasta hace pocos años las infecciones por *S. aureus* meticilina resistentes generalmente se adquirían dentro de los hospitales. Sin embargo, a finales de los años 90, emergieron cepas SARM en adultos y niños sanos en las comunidades. Estas cepas originaron infecciones en la comunidad. (Naimi, et al., 2003). Las cepas de *S. aureus* que causan estas infecciones se han denominado cepas SARM adquiridas en la comunidad (“community-acquired MRSA”, SARM-AC). Para clasificar una cepa de *S. aureus* como SARM-AC se debe cumplir con la condición de que sea una cepa aislada en la comunidad en pacientes que no tienen los factores de riesgo de un infección nosocomial SARM. Estos factores son: hospitalizaciones frecuentes y recientes, vivir por largos periodos en las salas de cuidados especiales, estar expuesto a medios invasivos como sondas o catéteres, haber tenido cirugías recientes o diálisis, emplear drogas intravenosas o una prolongada exposición a los antibióticos. (Said-Salim, et al., 2003). La prevalencia de las cepas SARM-AC en personas sin factores de riesgo nosocomial que viven en la comunidad está en aumento (Charlebois, et al., 2002). Se han producido varios brotes epidémicos de SARM-AC en los últimos 6 u 8 años algunos de estos brotes se han registrado en: cárceles, equipos de futbol americano; militares, homosexuales, y nativos americanos de Alaska y de las Islas del Pacífico. En todos estos casos la población afectada no tenía los factores de riesgo establecidos para adquirir, infecciones por SARM-AH (Said-Salim, et al; 2003, Charlebois et al; 2002, Shukla, 2005, Graham, et al; 2006, Weber 2005). Los síntomas clínicos causados por SARM-AC son principalmente infecciones en la piel y tejidos blandos, neumonía necrotizante y septicemia. Se han reportado casos fatales de purpura fulminante. Esta enfermedad hemorrágica está asociada con sepsis y amplia necrosis tisular. Uno de estos casos fatales se debió a la leucocidina de Pantón-Valentine y la enterotoxina estafilocócica C, producidos por una cepa SARM-AC (Shukla, 2005). Los genes de resistencia a meticilina (se explicará con más detalle del gen *mecA* y del cassette en los apartados 2.5 y 2.6)

se encuentran en una región de reciente identificación (*SCCmec* IV o V) distinta a la que poseen los SARM hospitalarios clásicos, que no contienen los genes de resistencia a antibióticos adicionales que son típicos de las cepas SARM-AH. Debido a esto sólo son susceptibles a los antibióticos β -lactámicos y ocasionalmente a la eritromicina (Ito, et al., 2004, Tiensasitorn, et al., 2002, Enright, 2006). Solo unas pocas clonas de SARM-AC se han diseminado a través del mundo. Se han identificado dos clonas principales, la USA 300 y la USA 400. La clona USA 300 se ha localizado en jugadores de fútbol y presos, mientras que la cepa USA 400 se ha encontrado en varias poblaciones étnicas. La clona USA 300 ha causado brotes epidémicos de infecciones de la piel y tejidos blandos en individuos sanos de 21 estados de EUA, Canadá y Europa. Se cuenta ya con la secuencia completa de su genoma, Además del gen PVL y del *SCCmec* IV, cuenta con nuevo elemento genético móvil que codifica una vía para la desaminación de la arginina. Se le denomina elemento genético móvil para el catabolismo de la arginina (“arginine catabolism mobile element”, ACME), y puede contribuir, al crecimiento y supervivencia de la clona USA 300. Las infecciones causadas por cepas resistentes a la meticilina pueden ser más difíciles de manejar y con un costo mayor. Se deben establecer las estrategias más efectivas para prevenir que emerjan y se diseminen las cepas SARM-AC. El control de infecciones en los hospitales debe jugar un papel importante. Las estrategias en la comunidad pueden enfatizar la detección oportuna, el tratamiento adecuado de las infecciones y la optimización de las medidas básicas de higiene. Una estrategia adicional que no se han establecido es eliminar la colonización de *S. aureus* en portadores sanos, ya que podrían aplicarse estudios epidemiológicos a poblaciones y condiciones específicos para prevenir focos de infección. En EUA los Centros de Prevención y Control de Enfermedades (CDC), han realizado recientemente un estudio nacional para determinar la prevalencia y colonización de *S. aureus* y cepas SARM en la población (Kuehnert, et al; 2006). En este estudio se encontró que el 32.4% de la población es portadora de *S. aureus* y el 0.8% esta colonizado con cepas SARM. Se estima que 89.4 millones de

estadounidenses presentan *S. aureus* y 2.3 millones son portadores de cepas SARM.

1.3.-Infecciones intrahospitalarias (nosocomiales)

Las infecciones nosocomiales son un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social. Son de importancia clínica y epidemiológica debido a que presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad. En EUA se reporta una incidencia promedio del 3 al 5%. En México se tiene reportado un promedio del 10 al 15%. El impacto de este problema es la mortalidad, la cual se estima en promedio de un 5%. Se estima que en México, en 1996 de las 6, 600, 000 y 250, 000 personas presentaron infección nosocomial y de estos murieron entre 30, 000 y 45, 000 por esta causa (Ponce de León, et al; 1999, tapia, 1999). El área hospitalaria con mayor frecuencia de infecciones nosocomiales es la unidad de terapia intensiva. Las infecciones más frecuentes son en vías urinarias, seguidas por las de herida quirúrgica, bacteriemias y neumonías. (Ponce de León et al; 1999, Frid Kin, Gaynes, 1999). Los estafilococos se han reconocido como un grave problema en los hospitales y se han establecido políticas de rutina sobre la vigilancia de enfermedades estafilocócicas adquiridas en los hospitales. *S. aureus* es la principal causa de infecciones adquiridas después de una operación y la segunda causa más frecuente de neumonía nosocomial y bacteriemia. *S. aureus* y los estafilococos coagulasa negativos juntos representan el 21% de las 4 millones de infecciones nosocomiales por *S. aureus* representan un gasto elevado. En México se cuenta con la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), la cual reportó que en el periodo de 1998-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y cuarto lugar en mortalidad (Díaz- Ramos, 2006). Un hospital pediátrico de tercer nivel reportó un amplio predominio de *S. aureus* en las bacteriemias nosocomiales (Díaz-Ramos, et al; 2006). En el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán” se encontró que *S. aureus* es el segundo microorganismo aislado en infecciones de heridas quirúrgicas y también es responsable de bacteriemias (Ponce de León et al; 1999).¹⁷ En un estudio realizado en hospitales pediátricos, se encontró que *S. aureus* ocupa el

cuarto lugar de microorganismos causantes de infecciones nosocomiales (Ávila-Figueroa, et al; 1999). Diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales en México indican que del 8.3 al 36% de estas infecciones se debe a *S. aureus* (Velázquez- Meza; 2005). A continuación se menciona la epidemiología de las infecciones nosocomiales en animales.

La frecuencia con la que *S. aureus* se aísla de perros o gatos es de menos del 10% de las muestras, y suele aislarse del pelo de los perros o de exudados nasales o nasofaríngeos. Este indicador incrementa al 38% si la población analizada es de animales con heridas abiertas, heridas postoperatorias o si portan un aparato ortopédico o implantes (Leonard y Markey, 2008). Walther et al, (2008) y Malik et al 2006). Utilizando MLST, PFGE, detección de la Leucocidina Pantón-Valentine, secuenciación del casete cromosómico del gen de la recombinasa (*ccr AB*) y/o caracterización del casete cromosómico de resistencia a meticilina (*SCC-mec*), encontraron que algunos genotipos de SARM, particularmente el ST239, se distribuyen entre la mayoría de las especies muestreadas, lo cual sugiere que estas cepas se transmiten fácilmente en las instalaciones de las clínicas veterinarias. Una situación similar sucede en el caso de *S. aureus* aislados de muestras clínicas de caballos con lesiones expuestas, fistulas, cateterizaciones o infecciones en articulaciones (Cuny et al; 2006). El ST254 fue el más frecuente. Tanto el ST254 como el ST239 forma parte del CC8, cuyos ST frecuentemente se asocian a infecciones intrahospitalarias en humanos. Los hallazgos anteriores sugieren que existe una transmisión constante de cepas de *S. aureus* entre humanos y animales, lo cual destaca el potencial zoonótico de las infecciones causadas por *S. aureus*. En México no existen reportes de la prevalencia de *S. aureus* en infecciones asociadas a animales exóticos o de compañía.

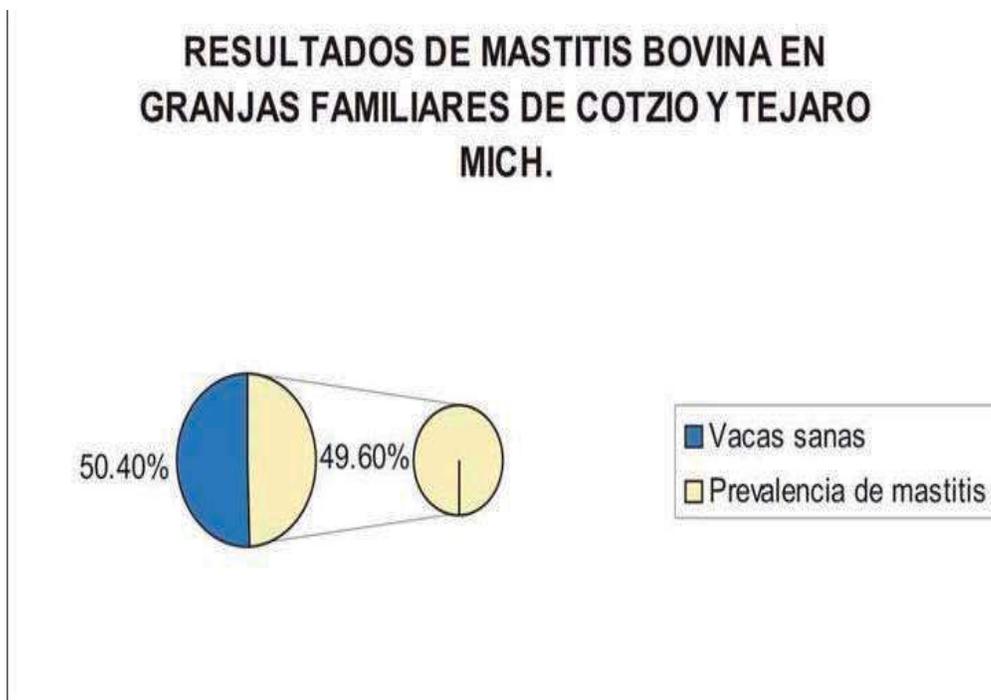
1.4.-Mastitis Bovina

La mastitis es la enfermedad más común en los bovinos en todo el mundo y la más costosa, para el productor por las pérdidas de leche. Las vacas con glándulas severamente afectadas se envían al rastro y el dinero invertido en Médicos

Veterinarios y medicamentos se pierde. La mastitis es un síndrome ya que es multifactorial; es solamente un signo de más de 100 enfermedades y clínicamente significa inflamación e infección de la glándula mamaria. Esta se puede clasificar en mastitis subclínica y mastitis clínica. La mastitis subclínica se caracteriza por una apariencia saludable de la glándula mamaria, la leche y la vaca. La glándula mamaria a la inspección y a la palpación aparentemente se encuentra sin cambios en el parénquima glandular, la leche extraída aparentemente no tiene cambios en cuanto a su color, sabor, consistencia, etc y la vaca no presenta signos de infección como fiebre, anorexia, atonía, taquicardia, polipnea, etc., es la que mas pérdidas produce porque no presenta signos ni síntomas aparentes, y el productor no le toma importancia. La mastitis clínica se caracteriza por presentar alteraciones que se pueden detectar, como cambios en el color de la leche, pudiéndose presentar amarillenta, rojiza, etc., cambios en su sabor, cambios en la consistencia presentándose cremosa, espesa, etc, acompañada de coágulos y/o tolonrones y/o natillas, a la palpación podemos detectar cambios en el parénquima glandular detectándose caliente, firme, dura, etc, y los animales pueden presentar fiebre, taquicardia, polipnea, anorexia, atonía, etc, representando perdidas para el productor (Ávila, et al; 1996). En mastitis subclínica se requerirá para su diagnóstico de pruebas a base de reactivos como es el de la Prueba de California y con esto poder darnos cuenta cuando empiece una inflamación o una infección para poderla curar o prevenir a tiempo, esta prueba barata, fácil y rápida de realizar. En la Prueba de California (CMT) se utiliza un reactivo que está constituido por un detergente el alkilarilsulfonato de sodio, un colorante el purpura de bromocresol. Ya que en cualquier inflamación o infección estarán presentes células somáticas (linfocitos y monocitos asociados a la inflamación), estas son lisadas por el detergente, exponiendo el acido desoxirribonucleico el cual va ha ser coloreado por el colorante. A mayor daño del parénquima glandular, habrá mayor inflamación e infección, por lo tanto, más células somáticas y más reacción. La lectura de la Prueba de California se debe de hacer en 10 segundos, en una paleta de plástico blanco con 4 compartimientos

se depositan de 3 a 3 ml de leche y la misma cantidad de reactivo mezclándolos suavemente, la lectura debemos hacerla en 10 segundos. Detectamos una reacción o lectura negativa cuando al mezclar el reactivo con la leche no hay cambios, hay entre 0 y 200,000 células somáticas (CS) por mililitro de leche de las cuales existe una leve viscosidad que desaparece antes de los 10 seg., hay de 200,000 a 500,000 CS, de las cuales del 30 al 40% (PMN) disminuyendo aproximadamente el 5% de la producción de esa glándula. Positiva 1 cuando reacciona transformándose en viscosa como aceite, hay de 500,000 a 1, 000,000 CS, con 40 a 60% de PMN, disminuye 10%. Positiva 2 cuando reacciona muy viscosa como gel, hay de 1.5 millones de CS con 60 al 70% de PMN, disminuye 15%. Positiva 3 cuando el gel se pega a la paleta, hay más de 5 millones de CS, con 70 al 80% de PMN, disminuye 20% de la producción. Detecta el pH, leche alcalina color morado y ácida color amarillo esto mas sirve para escoger el tipo de antibiótico para el tratamiento (Trejo, et al; 1996). En el año 2008, Michoacán ocupó el lugar 12 en la producción de leche a nivel nacional con una producción anual de 331.9 millones de litros, lo cual representa el 3.2% de la producción nacional (Boletín de Leche, 2008). La producción de leche se ve significativamente mermada por la mastitis bovina (Ávila et al; 2001) reportaron que en unidades pequeñas de producción de leche la prevalencia de mastitis subclínica, clínica y con glándula improductiva era de 48%, 12% y 9%, respectivamente. En estos hatos no se observó diferencia en la prevalencia de la mastitis en función del tipo de ordeño. En cambio, en un estudio en el estado de Morelos, este mismo grupo reportó que la prevalencia de la mastitis subclínica si mostraba diferencias en relación al tipo de ordeño, manual (57%) o mecánico (33%), lo cual correlaciona con diferencias en la calidad microbiológica de la leche (Ávila et al; 2002). Entre las bacterias patógenas que se han asociado a la mastitis en México, *S. aureus* se ha aislado con alta frecuencia en brotes de mastitis subclínica en Hidalgo (64.28%; Manzano et al; 2004), y Sinaloa (78.57% Luque et al; 1993). No existen reportes que caractericen la diversidad de los aislamientos de bacterias patógenas asociados a la mastitis bovina en México, aunque existen reportes recientes del

análisis del polimorfismo de genes de virulencia entre aislamientos de *S. aureus* obtenidos de vacas con mastitis clínica o subclínica (El-Sayed et al; 2006), de la ausencia de genes de virulencia (Franco et al; 2008) en *S. aureus*. En México no existen datos de caracterización molecular mediante MLST o PFGE de cepas aisladas de bovinos. En estudios preliminares realizadas en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en nueve establos en las comunidades de Cotzio y Tájaro en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, se encontró una prevalencia de mastitis bovina de 45.83%; 2.08% para mastitis clínica y 43.75% para mastitis subclínica. *S. aureus* se aisló en el 18.63% de los casos (Solorio-Rivera, y Valdez- Alarcón, no publicados).



Grafica 1: Resultados globales obtenidos de mastitis bovina en granjas familiares de la región de Cotzio y Tájaro Michoacán (Imagen tomada de Elizabeth Granados Beltrán, 2009).

2.- Antecedentes

La genómica comparativa y el análisis de genomas mediante microarreglos han permitido detectar polimorfismos importantes en genes de virulencia y su posible relación con la especificidad del hospedero, Fitzgerald y col, secuenciaron el genoma de la cepa ET3-1, un aislamiento representativo de *S. aureus* asociado a mastitis bovina (Fitzgerald et al., 1997). Por su parte, (Highlander et al., 2007) al secuenciar los genes de dos aislamientos de la cepa USA 300, uno SARM y el otro SASM, encontraron que la estructura genética de los aislamientos era muy similar y que solo cambios puntuales en la estructura de algunos genes podrían modificar la virulencia en el hospedero. Este resultado sugiere que hay alelos particulares que pueden asociarse específicamente a la patogénesis de las cepas de bovinos y conferir especificidad para este hospedero. Posteriormente construyeron microarreglos que hibridaron con cepas de *S. aureus* obtenidas tanto de humanos como de bovinos y encontraron genes presentes de manera conservada en los aislamientos de bovinos y ausentes en los humanos. (Lindsay, et al., 2006). Utilizando estos microarreglos, hibridaron 56 muestras de ADN de vacas, caballos, cabras, borregos, y de camello y los compararon con 161 aislamientos de humanos. Se detectaron cuatro linajes únicos de animales mediante MLST, pero algunos aislamientos de linajes de humanos también se asociaron a mastitis bovina. En los microarreglos se imprimieron secuencias de las regiones variables de los genes de la coagulasa y proteínas de unión a fibronectina, entre otros, reportadas en los genes de aislamientos de humanos (Sung et al., 2008). O' Hara et al (2008) y Dumitrescu et al, (2008) reportan la existencia de mutaciones en la región codificante del gen que codifica para la leucocidina de Panton-Valentine (PVL). Particularmente la sustitución H176R correlaciona tanto con la localización geográfica de los aislamientos como con la presencia del gen *mecA*. Otra de las variantes llamada H2, correlacionó con el linaje de los aislamientos, asociados a los complejos clonales CC1, CC5, CC30 y CC121.

2.1.- Antecedentes en el Laboratorio.

En el laboratorioCMEB-FMVZ-UMSNH.... caracterizamos aislamientos de *S. aureus* obtenidos de vacas con mastitis en las poblaciones de Cotzío y Tejáro. Las técnicas empleadas fueron Multilocus Sequence Typing (MLST), análisis de macrorestricción mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE) y polimorfismo de dos genes de virulencia *spa* que codifica para la proteína A de *S. aureus* y *coa* que codifica para la coagulasa. Los aislamientos presentaron tipos de secuencia (STs) ST97 y ST8, típicos de aislamientos de bovinos o de infecciones adquiridas en la comunidad, respectivamente. El análisis de PFGE permitió discriminar individualmente los aislamientos y establecer tres pulsotipos que correlacionaron con los STs. Para el polimorfismo de los genes *coa* y *spa* se detectaron dos y cinco alelos, respectivamente que contribuyeron a la discriminación de los aislamientos. Los alelos *coa* I y *spa* V fueron los más abundantes. El análisis de macrorestricción por PFGE separó los aislamientos caracterizados en tres grupos. En el grupo I de PFGE se agrupan los aislamientos del periodo 2003 y 2004, mientras que los del 2008 están representados en los grupos II y III; de éste último solo hay un representante. La MRI-151 se identificó como *S. aureus*, pero a nivel de secuenciación se mostró con diferencias colocándolo dentro del género *Staphylococcus*, pero con una rama separada, por lo cual sugiere que corresponde a una nueva especie, pero cercana a las especies de *S. condimentii*, *S. carnosus*, *S. piscifermentans* (Granados-Beltrán-Valdez Alarcón).

A continuación se muestran los alotipos de *S. aureus* tanto de los genes de la coagulasa *coa* como de la proteína A *spa* de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino se presenta un gel de PFGE de los aislamientos de bovinos de mastitis subclínica donde se observa el genoma completo de *S. aureus* así como el esquema donde se discrimina la población microbiana utilizando herramientas de biología molecular como MLST y PFGE identificando un secuenciotipo de ST8 de origen humano y ST97 de origen bovino utilizando las amplificaciones de los genes de la *coa* y *spa*.

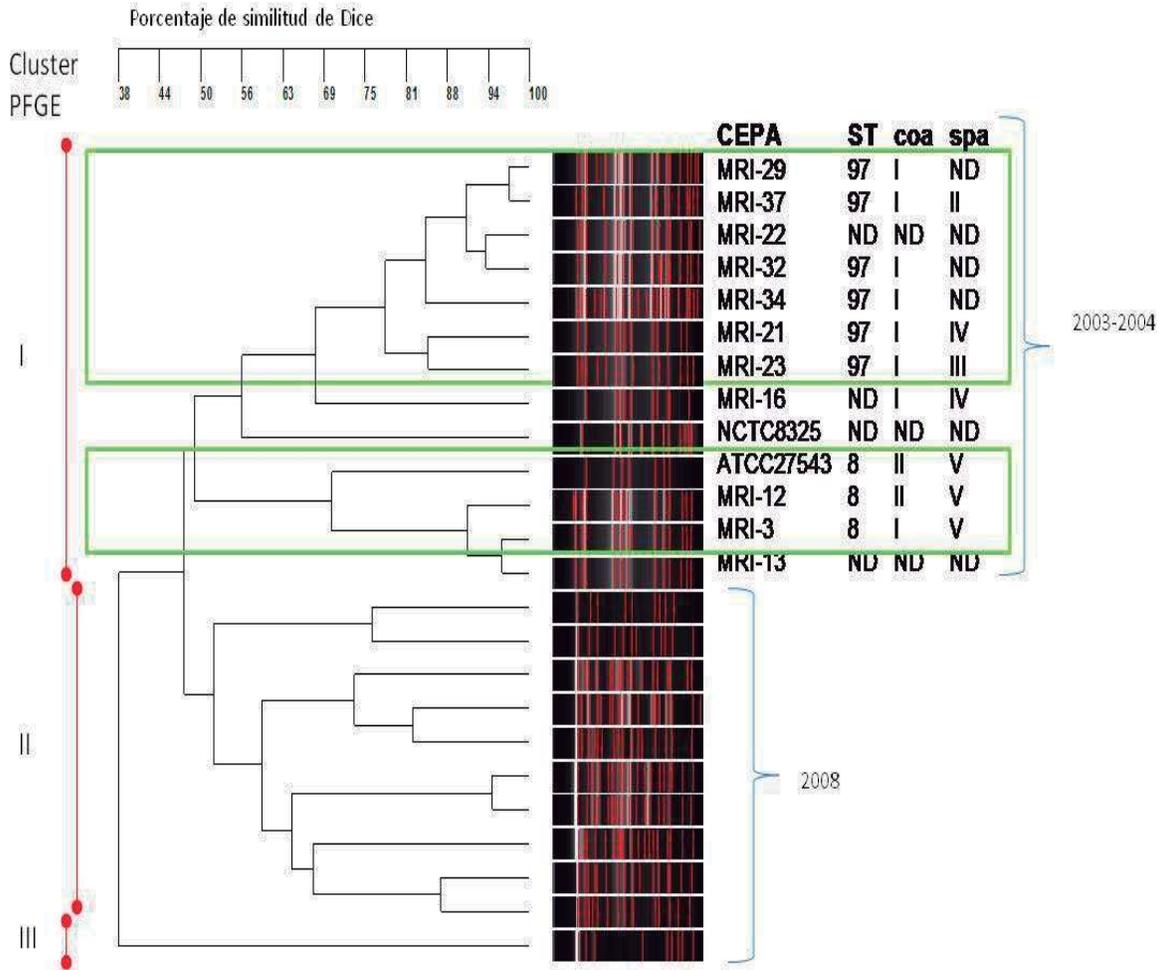


Figura 1.- Integración de los análisis por PFGE, MLST y polimorfismo de los genes *coa* y *spa*. ST, Secuenciotipo; *coa*, variantes de *coa*; *spa*, variantes de *spa*; ND, no determinado. (Tomado de Valdez-Alarcón y col.2009).

Se presenta a continuación el árbol filogenético de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino, obsérvese que la cepa MRI-151 es la más lejana filogenéticamente de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino presentando una nueva especie según estudios realizados por el equipo de trabajo del Dr. Juan José Valdez Alarcón en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB).

2.2.- Clasificación:

SARM (*S. aureus* resistente a meticilina), SASM (*S. aureus* sensible a meticilina).

Se han identificado cinco clonas pandémicas: Ibérica, Brasileña, Húngara, Nueva York/ Japón y Pediátrica (Velázquez-Meza, 2005). La clona Ibérica se describió primeramente en España en 1989 y posteriormente se reportó en Portugal, Italia, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Suiza, Francia, Polonia, República Checa y EUA. La clona Húngara se encontró por primera vez en hospitales de Hungría en 1998 y después se localizó en Tailandia. La clona Nueva York/ Japón se determinó como una clona dominante en hospitales de Nueva York en 1998 y posteriormente se encontró en Japón. La clona Pediátrica se identificó en 1992 en hospital pediátrico de Portugal y después se ha localizado en Polonia, EUA, Argentina, Colombia y Brasil. La clona Brasileña descrita en un principio en Brasil en 1995, se ha diseminado en Portugal, Argentina, Uruguay, Chile y República Checa (Marcos-Vivoni, et al., 2005). La clona M, detectada en 1997, en un hospital pediátrico de la ciudad de México logro desplazar completamente en 2002 a la cepa Nueva York/Japón que se introdujo en el hospital en 2001 (Aires de Sousa, et al; 2003). Se ha tratado de explicar la evolución que han sufrido las clonas de SARM. En varios estudios se han comparado cepas de principios de la década de los años 60, contemporáneas. En estos estudios se encontró que cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM) de esa época probablemente sirvieron como receptoras del determinante de la resistencia a meticilina. El fondo genético de este grupo de aislados SASM es muy similar al de la clona Ibérica, por lo que los determinantes genéticos presentes en las cepas SASM son esenciales para algunos aspectos de la patogenicidad y/o virulencia y se han conservado hasta las clonas contemporáneas (Enright, et al; 2002). Al igual que *S. aureus* sensible a meticilina (SASM), las cepas SARM ingresan al medio hospitalario a través de pacientes, visitantes o trabajadores asistenciales. Aunque los pacientes hospitalizados constituyen el reservorio fundamental con altas tasas de prevalencia, el personal asistencial colonizado por cepas SARM se puede

convertir en fuente importante de infección de pacientes más susceptibles, en especial, para los que permanecen en la unidad de terapia intensiva (Mendoza, et al; 2001).

2.3.-Resistencia a antibióticos

S. aureus puede adaptarse rápidamente a la presión selectiva de antibióticos, y como resultado adquiere resistencia. Los mecanismos por los cuales adquiere resistencia son clasificados en dos principales categorías: mutación del gen cromosomal y adquisición de genes de resistencia. *S. aureus* puede adquirir genes exógenos de resistencia antibióticos por transferencia horizontal de genes o transducción mediada por bacteriófagos, o por elementos genéticos móviles así como plásmidos y transposones. (Durenberg, et al, 2006). La resistencia de *S. aureus*, a los agentes antimicrobiales de las clases MLS (resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas) es comúnmente basado en la modificación en el sitio del objetivo de la subunidad 50S ribosomal. La modificación del sitio del objetivo, es el mecanismo de resistencia más extensamente distribuido, y hace referencia a la dimetilación de un residuo de adenina en el 23S ARNr. *S. aureus* posee dos fenotipos de resistencia a los MLS. El primer mecanismo es conocido como el fenotipo MLS_B y es codificado por el gen *erm* (A, B, C) encontrado en el transposón *Tn554* de los tipos II Y III de *SCCmec*. El segundo mecanismo es codificado por el gen *mrsA*, a través del flujo activo de salida del antibiótico por una bomba dependiente de ATP, con lo cual se mantienen las concentraciones intracelulares por debajo del nivel necesario para la unión a los ribosomas, lo cual confiere resistencia a los 14 miembros (eritromicina), a los 15 miembros de los macrólidos, y las lincosamidas (clindamicina) y a estreptogramina (Ang, et al; 2004, Schito, 2006, Werckenthin, et al; 2001). Aunque las fluoroquinolonas (ciprofloxacina) se introdujeron en la década de los 1980's para el tratamiento de infecciones bacterianas por bacterias Gram-negativas, también se utilizaron para tratar infecciones causadas por Gram-positivas como *Pneumococcus* y *Staphylococcus*. El objetivo principal de los quinolonas es la DNA girasa

bacteriana y la topoisomerasa IV, sin la cual la replicación del ADN se inhibe. La resistencia a quinolonas surgió rápidamente, particularmente entre cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, por la adquisición gradual de mutaciones cromosómicas (Schito, et al; 2006). Los aminoglicósidos fueron introducidos en 1944, y por los 1950s la cepa *S. aureus* resistente-aminoglicósidos había surgido. La resistencia a aminoglicósidos es principalmente debido a la inactivación del fármaco por los enzimas acetil-adeniltransferasas y las fosfotransferasas, que son codificados por los genes *aadD* o *ant* (Salmenlina, 2002), que confiere resistencia a kanamicina y neomicina respectivamente, estos genes localizados en el plásmido *pUB110* del tipo II de *SCCmec*; otro gen que es transportado por el plásmido *pUB110* es el gen (*ble*) que confiere resistencia a bleomicina. La resistencia a los aminociclitolos, tal como la espectomicina son comúnmente inactivados por adeniltransferasas (AAD9), que son enzimas codificadas por el gen *spc* localizado en el transposón *Tn554* (Snyder y Champnes, 1997). Cuatro diferentes genes (*tet*) que confieren resistencia a tetraciclinas han sido detectados en animales, asignados a las clases K, L, M y O, el gen *tet* (K) que es codificado por el plásmido Pt181 de *S. aureus* en humanos, le confiere resistencia por metilación en ciertas bases en el ARNr 16S (Werckenthin, et al., 2001). El glicopéptido vancomicina representaba una solución efectiva únicamente para tratar infecciones causadas por patógenos resistentes a meticilina, incluyendo a *S. aureus*. La vancomicina fue introducida en 1956, pero el primer aislado clínico completamente resistente a vancomicina *S. aureus* (SARV) fue reportado en el 2002, y esto por el sobre uso de este antibiótico en forma oral. Los glicopéptidos ejercen su efecto antimicrobial inhibiendo la síntesis de la pared celular de *S. aureus*, ensamblándose irreversiblemente a la terminal D-alanil-D-alanina de los precursores de la pared celular bacteriana, así inhibiendo la producción de la pared celular impidiendo la entrada a los glicopéptidos, así como la adquisición del gen *van A* que ocurrió por la vía de transferencia interespecífica del transposón *Tn 1546* (el transposón *van A*, portado dentro de un plásmido conjugativo de multiresistencia). La resistencia en los SARV es causada por la alteración del

péptido terminal de la pared celular D-alanil-D-alanina - D-alanil-D-lactato, previniendo la inhibición de la síntesis de la pared celular por la vancomicina (Appelbaum, 2006).

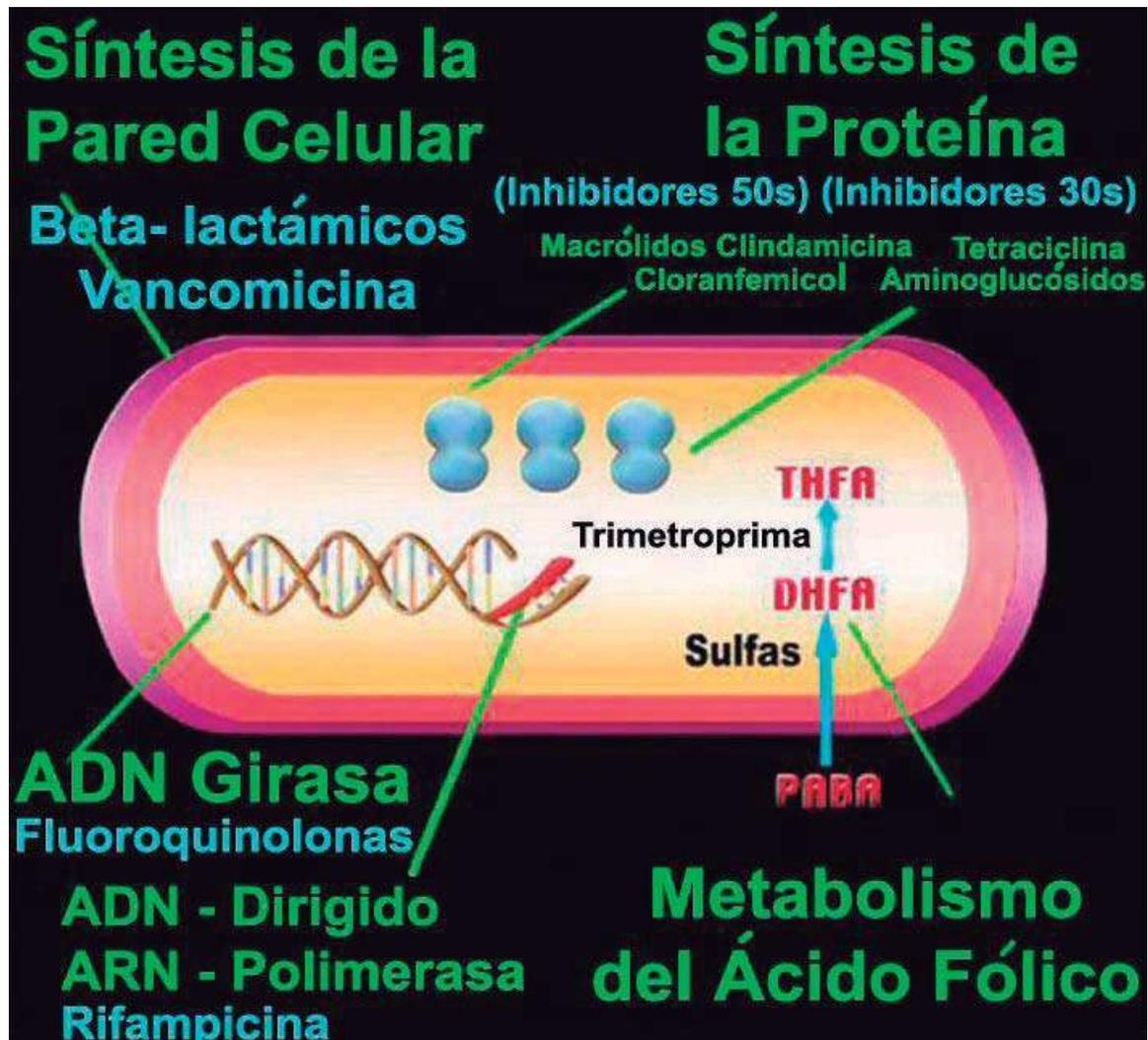


Figura 3.- Mecanismos de acción de algunos agentes antimicrobianos. (Tomado de Cavalieri y col, 2005).

En la figura No.3 se presentan los mecanismos de acción de los antibióticos más utilizados para tratar infecciones producidas por *S. aureus* se muestran las dianas celulares de estos antibióticos.

Antimicrobiano	Blanco celular	Genes de resistencia	Mecanismo de resistencia
Aminoglucósido (Gentamicina, Kanamicina)	ARNr 30S	<i>aacA-aphD</i> , <i>AADa</i> , <i>aadD</i> , <i>aphA</i> , <i>aphC</i> , <i>spc</i> , <i>strA</i> .	Modificación por acetiltransferasas, adeniltransferasas o alteración ribosomal de las fosfotransferasas.
Cloranfenicol	ARNr 50S	<i>Cat</i>	Modificación por acetiltransferasa.
Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina)	DNA girasa	<i>gyrA/ gyrB</i> <i>norA</i> <i>grlA</i>	Mutaciones en los genes de la DNA girasa, Bombas de expulsión, Mutaciones en el gen de la ADN topoisomerasa IV.
Glicopéptidos (Vancomicina)	Complejos D-Ala-D-Ala	<i>Van A</i>	Secuestro por la pared celular.
Macrólidos, lincosamidas	ARNr 50S	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>mrsA</i>	Metilación del ARNr, Bombas de expulsión.
Mupirocina	Isoleucil-RNAt-sintetasa	<i>MupA</i>	Producción de una isoleucil-RNAt-sintetasa modificada.
Sulfonamidas	Síntesis de ácido tetrahidrofólico	<i>Sula</i>	Sobreproducción de ácido p-aminobenzoico.
Tetraciclinas	ARNr 30S	<i>tetA(K)</i> <i>tetA(L)</i> <i>tetA(M)</i>	Bombas de expulsión Protección ribosomal.
Trimetoprim	Síntesis del ácido tetrahidrofólico	<i>DrfA</i>	Bypass por una dehidrofolato reductasa.

Cuadro 3: Mecanismos de resistencia identificados en *S. aureus*. (Tomado de Velázquez Meza, 2005).

2.4.-Genómica de *S. aureus*

En el genoma de *S. aureus* se divide en tres tipos de genes (Feng et al; 2008, Lindsay y Holden, 2006), Lindsay et al; 2006). Los genes del genoma basal (core genes) presentes en todos los genomas secuenciados son estables y sujetos a herencia vertical; los genes variables del genoma basal (core-variable genes, (CV genes), estables y sujetos a herencia vertical, pero con mayor variabilidad que los anteriores; los genes del genoma accesorio, presentes en elementos genéticos móviles profagos, islas genómicas e islas de patogenicidad). Los genes que codifican para determinantes de resistencia a antibióticos se encuentran codificados en casetes cromosómicos de *Staphylococcus* (como el *SCCmec*, que contiene al gen *mecA* que confiere resistencia a meticilina), plásmidos y transposones.

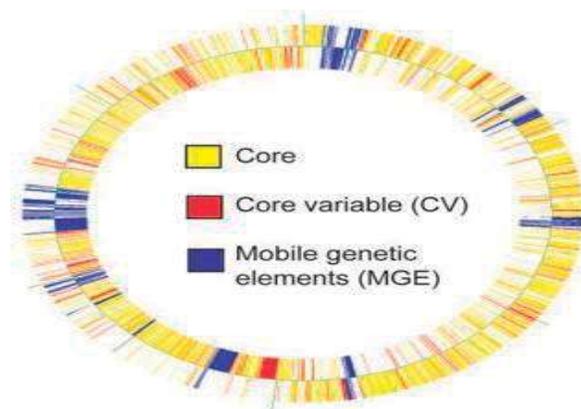


Figura 4.- Representación del genoma de la cepa SARM 252 donde se muestra de color amarillo los core genes de rojo los genes Core Variable (CV) y de purpura los elementos genéticos móviles (MGE). (Tomado de Lindsay y col, 2006).

2.5.-Gen *mecA*.

Desde que se descubrió la penicilina por Alexander Flemming en 1929, la tasa de mortalidad de pacientes era aproximadamente del 80% por *S. aureus*, hasta que esta se introdujo en los primeros 1940s, hubo una reducción alrededor del 85% de los aislados de *S. aureus*, ya que este fue originalmente susceptible a penicilina.

Sin embargo, la primera cepa resistente a este antibiótico fue aislada en 1942, primero en hospitales y más tarde en comunidades. Por 1948, arriba del 50% de cepas hospitalarias obtenían, resistencia a meticilina y el nivel se elevó al 80% por 1957. La resistencia de *S. aureus* a penicilina resultado de la adquisición de un plásmido (pI258) que codifica a una enzima (β -lactamasa) que inactiva el antibiótico al hidrolizar el anillo β -lactámico de la penicilina (Cavalieri, et al; 2005).

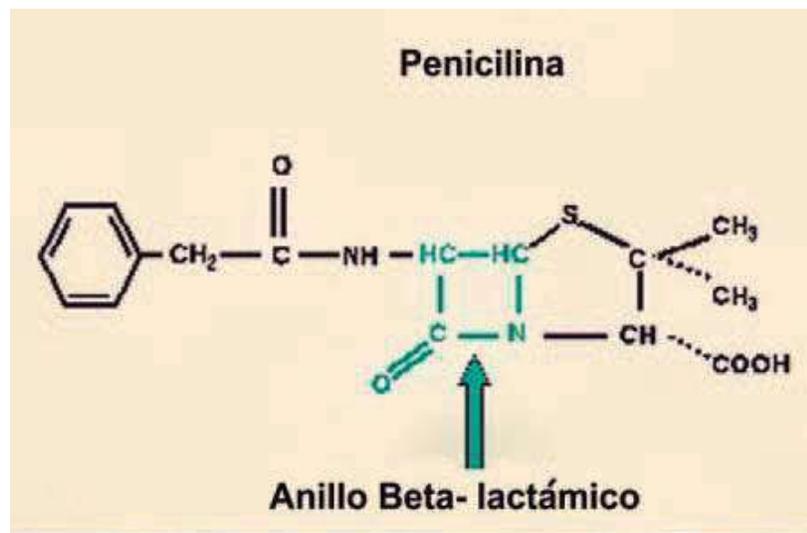


Figura 5: Molécula de penicilina con el anillo β -lactámico. (Tomado de Cavalieri y col, 2005).

La meticilina fue introducida en 1959 para tratar infecciones causadas por *S. aureus* resistente a penicilina. A principios de los años 1970's cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) causaron brotes epidémicos en Estados Unidos y en el Reino Unido (Cooke et al; 1986, Panlilio, et al; 1992). SARM aparentemente se originó por la adquisición del gen que codifica para la proteína de unión a penicilina PBP2A, la cual probablemente se originó a partir de un gen homólogo de *Staphylococcus sciuri*, que fue transferido horizontalmente a *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) (de Lencastre et al; 2007).

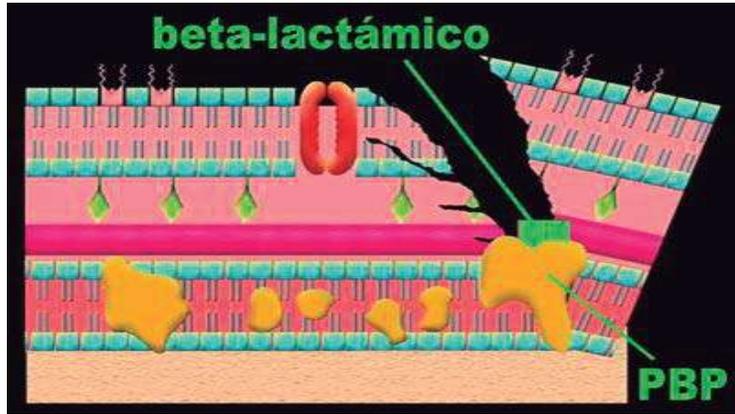
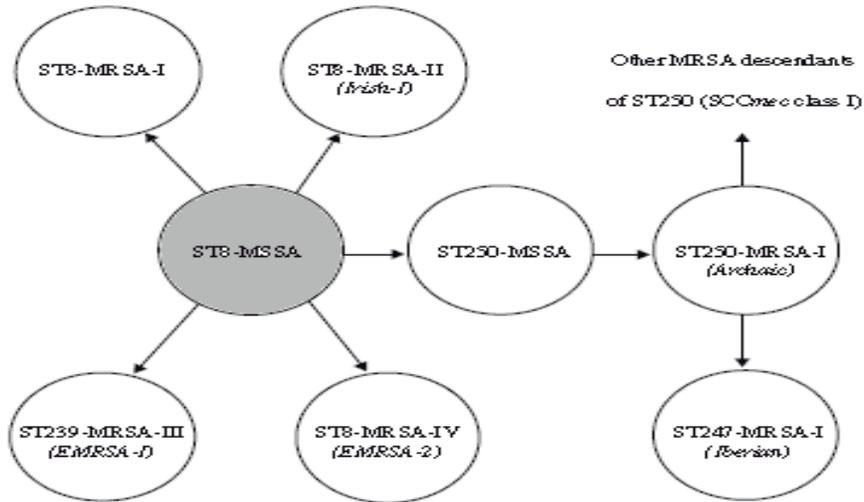


Figura 6.- Blanco de acción de un β -lactámico. (Tomado de Cavalieri y col, 2005).

Previamente, se ha descrito que los SARM son ampliamente divergentes, ya que han adquirido distintos tipos de *SCCmec* y han emergido en cinco linajes filogenéticamente distintos llamados complejos clonales (CCs: CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45) de un putativo ancestro SASM (*S. aureus* sensible a meticilina), al mismo tiempo, los modelos evolutivos indican que un mínimo de 20 adquisiciones del *SCCmec* han ocurrido en *S. aureus*. Estudios recientes indican que los SARM-AC transportan el *SCCmec* tipo IV y V y los tipos I, II y III de *SCCmec* son transportados por las SARM-AH (Robinson y Enright, 2004).



Cuadro 4: Evolución de la resistencia a meticilina en el CC8. (Tomado de Robinson y col, 2004).

2.6.-Casette Cromosómico de *Staphylococcus mec* (SCCmec) tipos de *ccrAB*.

La resistencia a algunos antibióticos de *S. aureus* es causada por la adquisición del elemento genético denominado complejo *mec* insertado en el casete cromosómico de *Staphylococcus* (SCCmec). SCCmec es un fragmento de 21-67 Kb insertado dentro del cromosoma de *S. aureus*, caracterizado por la presencia de terminales invertidas y directas repetidas un juego de dos genes de recombinación sitio-específica designados como casete cromosómica de la recombinasa (*ccrA* y *ccrB*), el cual codifica recombinasas de la familia invertasa/resolvasa, y el complejo del gen *mecA*, el cual codifica a la proteína de unión a la penicilina (PBP2A) de 78 KDa el cual tiene baja afinidad para antibióticos β -lactámicos y que le confiere resistencia a penicilina y meticilina (Katayama, et al; 2000).

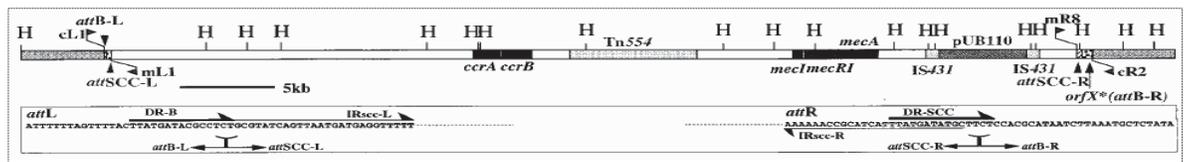


Figura 7: Estructura de la presencia de terminales invertidas y directas repetidas, *ccr* y complejo *mecA* en SCCmec. (Tomado de Katayama y col, 2000).

Además dos componentes reguladores *mecR1* (sensor) y *mec1* (represor). En *S. aureus*, tres grandes clases han sido descritas: la clase A que contiene el regulón *mecA* completo (*mecI-mecR1-mecA*), la clase B y C que contienen los genes reguladores de *mecA* interrumpidos por inserción de secuencias Ψ IS1272- Δ *mecR1-mecA* y IS431- Δ *mecR1-mecA*, respectivamente. Anteriormente se conocían cinco tipos principales (I-V) de SCCmec, los cuales diferían en tamaño y composición, habían sido descritos para *S. aureus* los tipos SCCmec definidos por la combinación de clases del complejo gen *mecA* con los alotipos de *ccr*: tipo I-*mec* clase B y *ccrAB* alotipo 1; tipo II-clase A y *ccrAB2*; tipo III-clase A y *ccrAB3*;

tipo IV-clase B y *ccrAB2*; tipo V-clase C y *ccrC*; los tipos II y III mostrando multirresistencia a medicamentos, ya que contienen plásmidos integrados (pvB110, pl258 y Pt181), y un transposón (*Tn554*). Estos tipos de *S. aureus* son encontrados principalmente en ambientes hospitalarios (De Lencastre y Oliveira, 2002). En la actualidad se conocen 8 tipos de *SCCmec* descritos en *S. aureus*. Los tres primeros tipos I,II,III. Estos fueron seguidos por los tipos IV a VIII de *SCCmec*. Por ejemplo el tipo I (1B) de *SCCmec* presenta el *ccr* alotipo 1 clase B del gen *mec*. Los otros tipos conocidos del *SCCmec* serían designados de la siguiente manera: tipo II(2A), tipo III(3A), tipo IV(2B), tipo V(5C2), el tipo VI(4B), tipo VII(5C1) y el tipo VIII(4A). Así los tipos de *SCCmec* deben ser designados por números romanos en el orden en que se les informa por los genes del complejo de *ccrAB* y el complejo del gen *mecA* juntos entre paréntesis. El tipo III del *SCCmec* fue considerado un fragmento de 67 kb de longitud y considerado el fragmento más largo de *SCCmec*. Sin embargo; en el 2006 se informó que este fragmento es una combinación de dos fragmentos pequeños *SCC*; *SCCmercury* y tipo III (3A) *SCCmec* (transportado por el alotipo 3 de *ccr* y la clase A del gen *mec*) integrado en el genoma. La cepa HDE288 de *S. aureus* fue reportada por primera vez como tipo IV de *SCCmec*, pero definido como el tipo VI de *SCCmec*. Para los subtipos de *SCCmec* deberían de ser definidos por la presencia de las secuencias de ADN de secuencias específicas en regiones J, incluyendo: (a) expresión de genes característicos, pseudogenes, o en regiones no codificadoras J distintas de los elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, secuencias de inserción y la mayoría que codifican la resistencia a los antimicrobianos. Estas partes restantes de *SCCmec* son llamadas regiones “Junkyard” (J1, J2 y J3), las cuales constituyen componentes no esenciales aunque, en algunos casos estas regiones transportan genes que confieren resistencia adicional a antibióticos. Por lo tanto, la estructura del *SCCmec* puede ser resumida como: *orfX*-J3-*mec*-J2-*ccr*-J1 respecto al origen de replicación. Otras regiones de *SCCmec* que pueden contribuir al potencial patogénico de *S. aureus* puede ser el gen *pls* presente en *SCCmec* tipo I y el operón *Kdp* presente en *SCCmec* tipo II, que codifican

3.- Estándares de CLSI

Las pruebas de susceptibilidad se indican cuando el microorganismo causal se cree que pertenece a una especie capaz de exhibir resistencia a los agentes antimicrobianos comúnmente usados ya que en la actualidad van apareciendo cepas cada vez más resistentes a los antibióticos ya que de un buen tratamiento evitamos las recaídas en la mastitis bovina, esto conlleva grandes pérdidas en el costo y en la producción lechera y ganadera. Entre los métodos más empleados tenemos: la dilución en caldo para la determinación de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y la difusión de disco en agar según la norma ISO 20776-1. Se tienen que sustituir las ediciones obsoletas a las ediciones actuales del CLSI/NCCLS debido a los rápidos cambios tecnológicos que pueden afectar a los procedimientos, métodos y protocolos anteriormente establecidos. Ya que al establecer una nueva revisión nos permitirá representar una información más actualizada para la selección de drogas, interpretación y control de calidad utilizando los procedimientos del CLSI. Se debe de emplear nuevos métodos de estandarización debido a que la detección de resistencia a metilina es muy complicada ya que presentan heterogeneidad de su expresión fenotípica puesto que 1 a 100,000 células expresan el gen dificultando su detección en el Laboratorio. Las pruebas recomendadas por el CLSI (Instituto para la Estandarización de Laboratorios Clínicos, según sus siglas en ingles) incluyen para el género *Staphylococcus*: el método del disco de oxacilina (OX, 1µg) en agar Mueller Hinton (MH) incubado a 35°C, y la prueba de descarte en agar oxacilina (MH conteniendo 4µg/ml de OX y 2% de NaCl) y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) a OX, por el método de E-test®. Se define la CIM como la mínima concentración del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y se interpreta de acuerdo a los criterios del CLSI, reportándose como resistentes a las cepas con una CIM $\geq 4\mu\text{g/ml}$ y como sensibles, aquellas cuya CIM era $\leq 2\mu\text{g/m}$. Para la determinación de resistencia a oxacilina (1µg) se utiliza el método de difusión del disco con cefoxitina (FOX

30µg), acorde a los criterios del CLSI. Toda cepa resistente al disco de FOX, se considera como resistente a OX (CLSI Clinical Laboratory Standardization Institute, 2007)⁶³. Adicionalmente, se ha demostrado que la cefoxitina (cefamicina) *in vitro*, induce la producción de PBP2A en cepas de *S. aureus*, meticilina sensibles (SAMS); por lo que el método de difusión del disco usando cefoxitina (FOX 30µg) ha probado ser un buen ensayo para la detección de resistencia de bajo nivel a OX en cepas de *S. aureus* (Sakoulos, et al; 2001, Okonagi, et al; 1989)^{64,65}. Se ha determinado la existencia de cepas SARM que no poseen el gen *mecA* y que deben su resistencia a la modificación de genes que codifican los PBP's normales, a la sobre-expresión de PBP's normales o a la hiperproducción β-lactamasa estafilocócica. Estas cepas presentan un nivel de resistencia "borderline" a OX (4 a 8 µg/ml) y no producen PBP2A. Además generalmente no se observa asociación con resistencia a otros antimicrobianos, a diferencia de lo que ocurre con las cepas *mecA* positivos. La inclusión del disco de Amoxicilina/ácido clavulánico en el antibiograma revela un fenotipo correspondiente a la hiperproducción de β-lactamasas. Por lo que se conoce dos tipos de resistencia la llamada resistencia intrínseca o resistencia verdadera mediada por el gen *mecA* y PBP2A y la resistencia dudosa (borderline) (BORSA) y la resistencia modificada (MODSA). La primera se da por la hiperproducción de β-lactamasas, sin presentar el gen *mecA* ni PBP2A y la segunda por la alteración de las PBP 1, 3 y 4 (Ulloa, et al; 2001>. Kirby-Bauer, 1996)^{66,67}. Cuando existe la resistencia a meticilina se opta en utilizar vancomicina, la resistencia a vancomicina apareció en el año 2006 ya que en el año 1997 aparecen por primera vez las primeras cepas de *S. aureus* de resistencia intermedia presentando una CMI de 4 a 8 µg/ml. La resistencia a vancomicina es mediada por el gen *vanA*, por lo que solamente 1 de cada 100,000 a 1,000,000 expresan el gen. Según los criterios del CLSI se consideran a las cepas de *S. aureus* sensibles, intermedios y resistentes los siguientes criterios: Se redujeron hasta ≤2 µg/ml como sensibles de 4 a 8 µg/ml como intermedios y ≥ 16 µg/ml como resistentes. Descarte de la resistencia a vancomicina en agar BHI (Infusión Cerebro Corazón) suplementado con 6 µg/ml de vancomicina

observándose por lo menos el crecimiento de una colonia. (CLSI (Clinical Laboratory Standardization Institute, 2007)⁶³.

4.-Hipótesis: Demostrar que los ST8 (origen humano) de los aislamientos de *S. aureus* de los aislados de mastitis bovina son SARM según lo reportado en la literatura.

5.-Objetivos:

5.1.-Objetivo General:

Detectar la presencia del gen *mecA* y de los genes del complejo de *ccrAB* y del cassette *SCCmec* en los aislamientos de *S. aureus* en muestras de leche de vacas con mastitis bovina y aislamientos clínicos de humanos, así como analizar las secuencias de los genes del *ccrAB* y del *SCCmec*.

5.2.-Objetivos específicos:

a).- Realización del antibiograma utilizando el método Kirby-Bauer utilizando los criterios del CLSI para la detección del gen *mecA* empleando el disco de cefoxitina (FOX) en vez de oxacilina (OX). Y determinación de la CIM de oxacilina (OX).

b).- Amplificación y detección del gen *mecA* de *S. aureus* en aislados de mastitis bovina, y de origen humano, así como la secuenciación de los genes del complejo de *ccrAB* y del cassette *SCCmec*, realización y análisis de secuencias de los genes del complejo de *ccrAB* y del cassette *SCCmec*.

6.- Materiales y Métodos:

6.1.-Bacterias.

Fueron 50 aislamientos de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis y un aislado de osteomielitis de origen humano, el muestreo se realizó en las comunidades de Cotzío y Tejáro en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, la cepa de aislado de humanos fue donada por la SSA (secretaría de salud). ATTC 27543, NTCC (cepa de referencia para el análisis de campos pulsados) y de osteomielitis, dos de origen bovino y una de origen humano. Las cepas de *S.*

aureus se identificaron con las pruebas de la coagulasa, catalasa, CHROMAgar™ (colonias rosas) y su crecimiento en AS110, observando su crecimiento incubándolos a 25-37°C/18 a 24 horas.

6.2.-Realización del Antibiograma de Acuerdo a los Criterios de CLSI de los Aislamientos de Origen Bovino y Humano de *S. aureus*.

Estandarización de la turbidez de 0,5 Mcfarland. Se prepararon soluciones madre de 0.048M de BaCl₂ (1.175% w/v BaCl₂. 2H₂O) y de 0.18M (0.36) H₂SO₄ (1% v/v). Se añadieron 0.5 ml de la solución de BaCl₂ en 99.5 ml de la solución madre de H₂SO₄, con agitación constante para obtener la suspensión. Se verificó la correcta, densidad de la turbidez estándar de medición utilizando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625nm fue de 0,08 a 0,13 para el estándar de 0,5 Mcfarland. Se transfirió el BaSO₄ en suspensión en alícuotas de 4 a 6 ml en tubos de tapa rosca del mismo tamaño que los empleados para la normalización del inóculo bacteriano. Se sellaron herméticamente los tubos y se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente. Se agitaron energéticamente la turbidez estándar de Sulfato de Bario en un agitador de vórtex antes de cada uso y para inspeccionar un aspecto uniformemente turbio. Si había partículas grandes. Si hay la presencia de partículas de látex hay que invertir suavemente, no en un mezclador vórtex. Como norma la densidad óptica del Sulfato de Bario debe verificarse o ser sustituido cada mes.

6.3.-Inoculación de las Placas de agar MH.

Se ajustó la turbidez con la suspensión equivalente al estándar de 0,5 Mcfarland, esto resultó en una suspensión que contiene aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC/ml) para *Escherichia coli* ATCC®25922. Se seleccionaron al menos 3 a 5 colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico de una placa de agar de cultivo puro. Se Tocó la parte superior de cada colonia con una asa de estéril y transfirió el crecimiento en un tubo de rosca que contiene 2 ml a 4 ml de solución salina isotónica estéril al 0.9%. De manera óptima, dentro

de 15 min después se ajustó la turbidez del inoculó al sumergir un hisopo estéril de algodón en la suspensión ajustada, se giró el hisopo varias veces y se presionó firmemente en el interior de la pared del tubo por encima del nivel del líquido, esto eliminó el exceso del líquido del hisopo. Se inoculó la superficie de la placa de agar MH (Mueller–Hinton) por un tapizado del hisopo sobre toda la superficie del agar estéril, se repitió este procedimiento de tapizado una o dos veces mas, rotando la placa aproximadamente 60° para asegurar una distribución uniforme del inoculo. Nota: la tapa se puede dejar entreabierto durante 3 a 5min pero no mas de 15 min para evitar cualquier exceso de humedad sobre la superficie del agar antes de que los discos de drogas sean impregnados. Se dispersó la batería predeterminada de los discos (antimicrobianos) en la superficie del agar inoculado. Cada disco se presionó para asegurar el contacto completo con la superficie del agar. Nota: los discos deben ser distribuidos uniformemente, no más cerca de 24mm de centro a centro. Por lo general, no más de 12 discos deben ser colocados en una placa de 150mm, o más de cinco discos en una placa de 100mm. Si los discos se colocan demasiado cerca del borde de la placa, las zonas de inhibición no puede ser de algunas drogas, debido a que difunden casi instantáneamente, un disco no debería ser trasladado una ves que ha encontrado en contacto con la superficie del agar coloque una nuevo disco en otro ubicación del agar. Se invirtieron las placas y se colocaron en una incubadora a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ (las pruebas a temperaturas superiores a 35°C puede no detectar SARM) dentro de los 15 min. Después de la aplicación de los discos. Después de 16 a 18 horas de incubación, se examinó cada placa y se observaron los halos de inhibición. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición. Nota: Para reportar como sensible a *S. aureus* a oxacilina se requiere de 24 horas. Incubar durante 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ con oxacilina. Con cefoxitina incubar de 16 a 20 horas para *S. aureus*. Se considera como sensible a oxacilina toda cepa cuyo halo de inhibición, fuese $\geq 13\text{mm}$; resistente, con halos de inhibición $\leq 10\text{mm}$ y como intermedios, aquellas con diámetro comprendidos entre 11 y 12 mm, para la determinación de resistencia a oxacilina (1 μg) se utiliza el método de difusión del disco con

cefoxitina (FOX 30µg considerando como resistente un halo de inhibición ≤ 21 mm y sensible; un halo ≥ 22 mm. Las cepas que resulten intermedias o resistentes a OX por el método de difusión del disco en agar, se les efectúa el descarte en agar MH conteniendo 2% de NaCl (p/v 0.68mol/l) y OX (4µg/ml). Las placas son incubadas a 24 horas a 35°C en aerobiosis y examinados luego, cuidadosamente, con luz transmitida para su lectura e interpretación, considerando, resistentes cuando se observa crecimientos de al, menos una colonia. Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) a OX, por el método de E-test®. Se define la CIM como la mínima concentración del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y se interpreta de acuerdo a los criterios del CLSI, reportándose como resistentes a las cepas con una CIM ≥ 4 µg/ml y como sensibles, aquellas cuya CIM era ≤ 2 µg/ml. En caso de resistencia a oxacilina (metilicina) se opta en usar vancomicina de acuerdo a los criterios del CLSI. Según los criterios del CLSI se consideran a las cepas de *S. aureus* sensibles, intermedios y resistentes los siguientes criterios: Se redujeron hasta ≤ 2 µg/ml como sensibles de 4 a 8 µg/ml como intermedios y ≥ 16 µg/ml como resistentes. No se utiliza la difusión en disco debido a que no detecta a los Estafilococos resistentes a vancomicina (menor a 32 µg/ml). Descarte de la resistencia a vancomicina en agar BHI(Infusión Cerebro Corazón) suplementado con 6 µg/ml de vancomicina con una incubación de 35 ± 2 °C durante 24 horas observándose por lo menos el crecimiento de más de 1 colonia, interpretándose como sensibilidad reducida a vancomicina. Consultar tabla 2C en M1009 para los valores de los diámetros. Los sensibilizadores para bacterias Gram positivas (Bio-Rad) fueron: Eritromicina (15µg), Clindamicina (2µg), Cefoxitina (30µg), Penicilina (10), Trimetoprim-sulfametoxazol ($^{1.25}/_{23.75}$), Linezolid (30µg), Tetraciclina (30µg), Rifampicina (5µg), Cloranfenicol (30µg), Ciprofloxacino (5µg), Gentamicina (10µg), Ampicilina (10µg), Quinupristina-Dalfopristina (15µg), Cefalotina (30µg), siguiendo las recomendaciones del Instituto para la Estandarización de Laboratorios Clínicos (CLSI previamente NCCLS) de acuerdo a los formatos M31-3, M02-A9, M07-A7 y

M100-518. Las bacterias se encubaron a 37°C por 18 horas y los aislamientos se clasificaron en resistentes, intermedios, sensibles.

6.4.-Extracción de ADN.

Se realizó por el método de Enrigh et al (2000). La metodología es la siguiente: Se preparó un cultivo de 2 a 3 ml de Luria de Bertani líquido y es incubado a 37°C con agitación durante toda la noche. Se agregan 500µl de cultivo a un tubo de 600µl y centrifugamos a 10, 000 rpm durante 10 min. La pastilla obtenida en el tubo se decanta y se resuspendió en 200µl de Buffer TE (10mM Tris-HCl con 1mM EDTA pH-8), 8µl lisozima y 16µl de lisostafina. Se resuspendió 40 µl de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), incubando a 37°C por 30 minutos. Se adiciono 20µl de Proteinasa K, incubando a 37°C por 30 min. Se resuspendió 1µl de RNAasa incubando a 37°C durante 15 min. Se realizó una incubación a 95°C durante 10 min, en el Termociclador Ependorf, una vez concluido el tiempo se mantiene dentro del Termociclador hasta la temperatura de 40°C, se retiran y se dejan reposar 5 min a temperatura ambiente. El ADN es precipitado añadiendo 20µl de NaCl y 0,6 volúmenes de Isopropanol manteniendo los tubos en congelación por 15 min. Se centrifugó a 10, 000rpm y el pellet se resuspendió en etanol al 70% manteniéndose en congelación por 15-30 min. Se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100µl de Buffer TE. Se corroboró la integridad del ADN en electroforesis en agarosa al 1% con Buffer TAE 1X y revelación de las bandas con Bromuro de Etidio (0,5µg/ml) durante 20 min.

6.5.- Concentración y estimación de la pureza del ADN por espectrofotometría.

Para determinar la concentración y pureza del ADN se hicieron lecturas de absorbancia a 260 nm, 280 nm y 320 nm, con el espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 100).

Pureza del ADN= A_{260} / A_{280} .

Un cociente con un valor entre 1.8 y 2.0 indica que nuestro ADN es puro.

Formula: $(As_{260})(\epsilon)(FD)/1000 = \text{ADN } \mu\text{g/ml}$.

Donde:

AS_{260} valor de la lectura de As_{260} nm, ϵ constante de proporcionalidad o coeficiente de extinción molar para el ADN de doble cadena y su valor es de 50 μg por cada unidad de absorbancia a 260 nm, FD factor de dilución que se obtiene mediante el inverso de la dilución para las lecturas de ADN de doble cadena y el valor de (1000) es el factor de conversión para convertir el valor a $\mu\text{g/ml}$.

6.6.-PCR con los oligos mecAp4 y mecAp7 para la amplificación del gen *mecA* para la determinación de resistencia a metilina.

La metodología es la siguiente: Amplificación de fragmentos de ADN de *S. aureus* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se mezcló 5ng de ADN genómico con la siguiente mezcla de oligos mecAp4, y mecAp7 (4 μl) a una concentración de 800nM de los 2 oligos, dNTP's de 1 μl a una concentración de 200 μM , Buffer 10X de 5 μl a una concentración de 1X, MgCl_2 de 3 μl a una concentración de 1.5mM y H_2O c.b.p 50 μl y Taq ADN polimerasa de 1 μl . Se incubó en el termociclador programado para los siguientes ciclos, 1 ciclo 94°C durante 4 min 30 ciclos de 30 seg. A 94°C, 30 seg. A 53 °C y 1 min a 72°C, 1 ciclo a 72°C durante 4 min, y enfriamiento a 8°C.

Oligonucleótidos	Tamaño del oligonucleotido	Secuencia	Tamaño del fragmento obtenido
mecAp4	20 pb	5'TCCAGATTACAACCTTCACCAGG'3	-----
mecAp7	20 pb	5' CCACTTCATATCTTGTAACG'3	-----

Cuadro 5.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *mecA*.

Se corroboró los productos de amplificación de PCR por electroforesis en agarosa al 2% con Buffer TAE 1X con un voltaje de 100V, revelación de las bandas con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml) durante 30 min.

6.7.-PCR con los oligos ccrAF1, ccrAR1, ccrBF1, y ccrBR1 para la amplificación de los genes del complejo de ccrAB.

La metodología es la siguiente: Amplificación de fragmentos de ADN de *S. aureus* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.- Se mezcló 5ng de ADN genómico con la siguiente mezcla de oligos ccrAF1, ccrAR1 (20pmol) y ccrBF1 y ccrBR1 (100pmol) con una cantidad de 0.1µl dNTP's a una concentración de 2mM, Buffer 10X de 5µl a una concentración de 1X, MgCl₂ de 3µl a una concentración de 1.5 mM y H₂O c.b.p 50µl y Taq ADN polimerasa de 1µl. Se incubó en el termociclador programado para los siguientes ciclos: 1 ciclo 94°C durante 4 min. 35ciclos de 30 seg a 94°C 60 seg a 42°C y 2min a 72°C, 1 ciclo a 72°C, durante 4 min y enfriamiento a 8°C.

Nota: No se realizo la amplificación de PCR con los oligos ccrAF1, ccrAR1, ccrBF1, y ccrBR1 ya que no se logro amplificar el gen *mecA*.

Oligonucleótidos	Tamaño del oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del fragmento obtenido
ccrAF1	296 pb	(DNA)_YCCWAAYTAYTGTTGGYCGTGT	-----
ccrAR1	296 pb	(DNA)_TKYTKGTGCRTTKATNCCT	-----
ccrBF1	496 pb	(DNA)_CGWYTRGCWGMWAAYACHTC	-----
ccrBR1	496 pb	(DNA)_CTTTTCGWCKYTTWTCRYTCC	-----

Cuadro 6.- Oligonucleótidos que se utilizan para la amplificación de los genes del complejo ccrAB.

Se corroboró los productos de amplificación de PCR por electroforesis en agarosa al 1% con Buffer TAE 1X con un voltaje de 100V, revelación de las bandas con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml) durante 30 min.

6.8.-PCR con los oligos 1517-R y 1095-F para amplificación de la región polimórfica X del gen de la Proteína A:

La metodología es la siguiente: Amplificación de fragmentos de ADN de *S. aureus* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se mezcló 1 µl de ADN con la siguiente mezcla oligo 1517-R y 1095-F (0.5µl) a una concentración de 200 nM de los 2 oligos, dNTP's de 4 µl a una concentración de 500 µM, Buffer 10X de 5 µl a una concentración de 1X, MgCl₂ de 1.5 µl a una concentración de 1.5 mM y H₂O c.b.p 25 µl y *Taq* ADN polimerasa de 0.5-1µl.

Oligonucleótidos	Tamaño del oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del fragmento obtenido
1517-R	24 pb	5'-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3'	420 pb
1095-F	24 pb	5'-GCTTTTGCAATGTCATTTACTG-3'	420 pb

Cuadro 7.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen de la región X polimórfica de la proteína A (*spa*).

Se incubó en el termociclador programado para los siguientes ciclos: 1 ciclo 95°C durante 10 min. 30 ciclos de 30 seg a 95°C 30 seg a 60°C y 45seg a 72°C, 1 ciclo a 72°C, durante 10 min y enfriamiento a 8°C. Se corroboró los productos de amplificación de PCR por electroforesis en Agarosa al 1 % con Buffer TAE 1X con un voltaje de 100V, revelación de las bandas con Bromuro de Etidio (0.5µg/ml) durante 20 min.

7.-Resultados:

Según criterios microbiológicos, en el laboratorio se aislaron previamente 50 aislamientos de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis el muestreo se realizó en las comunidades de Cotzio y Téjaro en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, las cepas utilizadas como referencia fueron ATTC 27543, NTCC (cepa

de referencia para el análisis de campos pulsados) y de osteomielitis, dos de origen bovino y una de origen humano. Las cepas de *S. aureus* se identificaron con las pruebas de la coagulasa, catalasa, CHROMAgar™ (colonias rosas) y su crecimiento en AS110, observando su crecimiento incubándolos a 25-37°C/18 a 24 horas, y mediante la prueba de California para identificar la mastitis clínica, subclínica y crónica.



Figura. 9



Figura. 10

Figura 9.-Colonias blanco-grisáceas β -hemolíticas típicas de *S. aureus* de las cepas de los aislados de mastitis bovina en las comunidades de Cotzio y Tejáro. Figura 10.-Colonias de color rosa típicas de *S. aureus* de los aislados de mastitis bovina en el medio CHROMAgar™.

Las cepas fueron identificadas por el grupo de trabajo del Dr. Juan José Valdez Alarcón, se volvieron a identificar para comprobar si realmente nuestros aislamientos eran *S. aureus* según lo reportado en el CMEB. Una vez identificados los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino de las comunidades de Cotzio y Tejáro se optó en realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos para detectar la presencia de resistencia a metilina en estos aislamientos siguiendo los protocolos establecidos por el CLSI.

A continuación se presenta un cuadro de los criterios de CLSI de los antibióticos utilizados para *S. aureus* de origen bovino para uso veterinario. En la siguiente tabla se ilustran los criterios del CLSI para *S. aureus* se menciona el tipo de

antibiótico, la clase, la cantidad en μg , CMI y algunos comentarios para la interpretación en caso de resistencia a algún antibiótico. En caso de resistencia a penicilina y ampicilina se considera la cepa como productora de las enzimas β -lactamasas, en la resistencia a meticilina se consideran las cepas de *S. aureus* como resistentes a las penicilinas estables a las penicilinasas como la meticilina, oxacilina, dicloxacilina, nafcilina, se habla del uso del disco de cefoxitina(30 μg) para la detección de la resistencia verdadera o homogénea mediada por el gen *mecA* como prueba estándar para detectar la resistencia a meticilina, se comenta el uso de la quinupristin-dalfopristin en caso de resistencia a meticilina y a vancomicina, en este estudio no se utilizó la vancomicina debido a que los aislados son sensibles a meticilina. Se hace comentarios del CLSI sobre la resistencia a penicilina y algunos aspectos que menciona el CLSI para determinar esta resistencia que son: a) Determinación de la CMI a penicilina, b) El uso recomendado de la difusión en disco del linezolid ya que no se ha detectado resistencia a este antibiótico. Criterios sobre la determinación de resistencia a eritromicina y clindamicina por el fenotipo inducible de la metilasa. Que consiste en colocar el disco de eritromicina a un lado del disco de clindamicina a una distancia de 15 mm cada uno observándose un enchatamiento en forma de D en el halo de inhibición del disco de clindamicina y presentando la eritromicina una resistencia homogénea en el halo de inhibición de eritromicina.

En el siguiente cuadro No.8 se resume los criterios del CLSI para la detección de susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino ya que estos son los empleados en Medicina Veterinaria. Los antibióticos que se mencionan en este cuadro fueron los que se usaron para la determinación de susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina de las comunidades de Cotzio y Tájaro.

Grupo Antibiótico	Clase	Concentración en disco Unidades o µg	Zona de diámetro en mm	CMI en µg/ml			Comentarios
			S I R	S	I	R	
Eritromicina	Macrólido	15	≥23 16-18 ≤13	≤0.5	4	≥8	Detecta la resistencia a clindamicina.
Clindamicina	Lincosamida	2	≥21 15-20 ≤14	≤0.5	1-2	≥4	El disco de clindamicina detecta la resistencia por el gen <i>ermA</i> .
Cefoxitina (por oxacilina)	Penicilina	30	≥22 ---- ≤21	≤4	-----	≥8	Detecta la resistencia mediada por el gen <i>mecA</i> .
Penicilina	Penicilina	10 unidades	≥29 ---- ≤28	≤0.12	---≥0.25		Detecta la resistencia a β-lactámicos.
Trimetoprim - sulfametoxazol	Inhibidores de la vía del folato	1.25 / 23.75	≥16 11-15 ≤10	≤2/38	----	≥4/76	-----
Linezolid	Oxazolidinona	30	≥21 -----	≤ 4	-----		No se conoce resistencia.
Tetraciclina	Tetraciclina	30	≥19 15-18 ≤14	≤4	8	≥16	-----
Rifampina	Ansamicina	5	≥20 17-19 ≤16	≤1	2	≥4	-----
Cloramfenicol	Fenicol	30	≥18 13-17 ≤12	≤8	-----	≥16	-----
Ciprofloxacina	Fluoroquinolona	5	≥21 16-20 ≤15	≤1	2	≥4	-----
Gentamicina	Aminoglicósido	10	≥15 13-14 ≤12	≤4	8	≥16	-----
Quinupristina – dalfopristina	Streptogramina	15	≥19 16-18 ≤15	≤1	2	≥4	Se utiliza en caso de resistencia a vancomicina.
Ampicilina	Penicilina	10	≥29 ----- ≤28	≤0.25	----≥0.5		Detecta la resistencia a β-lactámicos
Cefalotina	Cefalosporina	30	≥18 15-17≤14	≤8	16	≥32	Detecta la resistencia a cefalosporinas.

Cuadro 8._ Grupo de antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones producidas por *S. aureus* en bovinos. Estos antibióticos se utilizaron para las pruebas de susceptibilidad de acuerdo a los criterios del CLSI.

Una vez establecidos los criterios del CLSI se optó por hacer pruebas de susceptibilidad a antibióticos por el método de Kirby-Bauer a los aislamientos de

origen bovino de las comunidades de Cotzio y Tejáro para conocer la resistencia a meticilina. En el cuadro No.9 se presentan las resistencias que presentaron los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino de las comunidades de Cotzio y Tejáro por lo que se puede decir que existe un abuso discriminatorio de los antibióticos β -lactámicos, y un menor abuso en macrólidos, licosamidas, estreptograminas y cefalosporinas.

Aislamiento	Resistencias
ATCC	P ^R , AM ^K
NCTC	-----
Osteo	C ^R
MRI-3	P ^R , AM ^R
MRI-13	P ^R , AM ^R
MRI-14	P ^R , AM ^R
MRI-16	P ^K , AM ^K
MRI-21	P ^K , AM ^K
MRI-22	P ^K , AM ^K
MRI-23	P ^R , AM ^R
MRI-29	P ^R , AM ^R , Te ^R
MRI-32	P ^R , AM ^R , Te ^R
MRI-33	P ^R , AM ^R , Te ^R
MRI-34	P ^K , AM ^K , Te ^K
MRI-36	P ^K , AM ^K , Te ^K
MRI-37	P ^K , AM ^K
MRI-39	-----
MRI-147	P ^R , AM ^R , CC ^R , RA ^R , GM ^R , SYN ^R , CF ^R
MRI-155	P ^R , AM ^R
MRI-165	P ^R , AM ^R
MRI-161	P ^R , AM ^R ,
MRI-169	P ^R , AM ^R , CC ^R , RA ^R , CF ^R
MRI-162	P ^K , AM ^K
MRI-178	P ^R , AM ^R
MRI-148	P ^R , AM ^R
MRI-151	P ^R , AM ^R , CC ^R , RA ^R

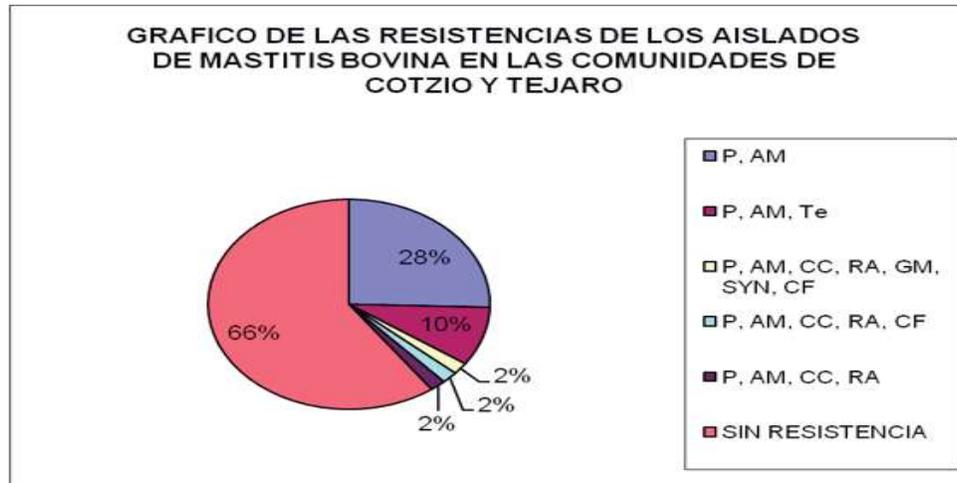
Cuadro 9.- Resultados de la resistencia de los aislamientos de *S. aureus* de las comunidades de Cotzio y Téjaro Michoacán.

Se utilizó el disco de oxacilina siendo los aislamientos resistentes a este antibiótico y determinando la CMI, motivando a realizar las pruebas moleculares para la

detección del gen *mecA* según lo reportado en el CMEB. En el cuadro No.9 se menciona la CMI a oxacilina (metecilina). En el cuadro No.10 se presenta la CMI a metecilina según los criterios del CLSI se considera resistente a metecilina toda cepa que presenta una CMI de 4 µg/ml en este estudio las cepas de *S. aureus* fueron resistentes a metecilina (oxacilina) pero al usar el disco de cefoxitina y la prueba de PCR se observó ausencia del gen *mecA*, presentando los aislamientos una resistencia heterogénea es decir por otros mecanismos genéticos.

Aislamiento	CMI a oxacilina (µg/ml)	Tipo de sensibilidad
ATCC	-----	
NCTC	-----	
Osteo	-----	
MRI-3	4	R
MRI-13	4	R
MRI-14	-----	
MRI-16	4	R
MRI-21	14	R
MRI-22	10	R
MRI-23	4	R
MRI-29	6	R
MRI-32	6	R
MRI-33	-----	
MRI-34	4	R
MRI-36	6	R
MRI-37	-----	
MRI-39	-----	
MRI-147	6	R
MRI-155	12	R
MRI-165	128	R
MRI-161	-----	
MRI-169	-----	
MRI-162	-----	
MRI-178	-----	
MRI-148	-----	
MRI-151	-----	

Cuadro 10. Concentración Mínima inhibitoria de metecilina de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino de las comunidades de Cotzio y Téjaro.



Grafica 2 . Este gráfico representa la incidencia de las resistencias mas frecuentes de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino de las comunidades de Cotzio y Tejáro.

En la grafica se presentan cepas de *S. aureus* resistentes a una cierta variedad de antibióticos: el primer patrón de resistencia fue a P, AM, presentando un frecuencia de resistencia de 28% el segundo patrón resistente a P, AM, Te, presento una frecuencia de resistencia de 10% el tercer patrón resistente P, AM, CC, RA, CF, el cuarto patrón resistente a P, AM, CC, RA y el quinto patrón resistente a P, AM, CC, RA, GM, SYN, CF, ambos patrones presentaron una resistencia del 2% y la de Osteomielitis que fue resistente a C. En estos antibiogramas se utilizaron la cepa de Osteomielitis y la NCTC la cepa de referencia para electroforesis de campos pulsados (PFGE) esto para saber si realmente eran resistentes a meticilina una por ser de aislado clínico y la otra por ser una cepa modificada genéticamente siendo sensibles a meticilina ya que estas cepas las consideramos como cepas de referencia. En la gráfica se muestra que en los aislamientos de *S. aureus* existe una discriminación o un abuso hacia los antibióticos β -lactámicos y un menor abuso a los antibióticos del grupo de los macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y tetraciclinas. En este estudio se observó resistencia a oxacilina pero con ausencia del gen *mecA*.



Figura 11.



Figura 12.



Figura 13.

Figura 11.- Sensibilidad del disco de cefoxitina (30µg) que nos indica la ausencia del gen *mecA* del aislado MRI-32 de *S. aureus*, nótese la resistencia a ampicilina. Figura 12.- Resistencia a penicilina y a tetraciclina del aislado MRI-32 de *S. aureus* nótese los pequeños halos de inhibición. Figura 13.- Resistencia a ampicilina del aislado MRI-32 de *S. aureus* nótese el pequeño halo de inhibición.

En la figura No.11 se observa el halo de inhibición del disco de cefoxitina que nos indica la ausencia de la resistencia homogénea mediada por el gen *mecA* de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino, en este estudio se observó resistencia a oxacilina por lo que se puede establecer que estamos hablando de cepas borderline de resistencia heterogénea a meticilina, en la figura No.14 se presentan las resistencias a penicilina, ampicilina y tetraciclina puesto que las cepas de *S. aureus* son productoras de las enzimas β -lactamasas que hidrolizan o degradan el anillo β -lactámico de la penicilina y ampicilina, en tanto a la tetraciclina la resistencia podría deberse a mutaciones en los ribosomas principalmente de las subunidad 30S de ARNr. En el CMEB tanto las cepas MRI-3, MRI-13 según un análisis de secuencia presentaron un secuenciotipo de ST8 de origen humano que según la literatura son resistentes a meticilina siendo estos sensibles al disco de cefoxitina y solamente presentando resistencia a penicilina, ampicilina y oxacilina por lo que se establece que podrían ser cepas borderline.



Figura 14.



Figura 15.



Figura 16.

Figura 14.- Resistencia a cefalotina, clindamicina y a penicilina del aislado MRI-147 de *S. aureus* nótese los pequeños halos en el Cefalotina y la penicilina y ausencia del halo en clindamicina. Figura 15.- Resistencia a cefalotina de la cepa MRI-151 de la nueva especie del genero *Staphylococcus* nótese el pequeño halo de inhibición. Figura 16.- Resistencia a cloranfenicol del aislado de cepa clínica de Osteomielitis de *S. aureus*.

En la figura No.16 se muestra la resistencia a cefalotina, clindamicina y penicilina del aislamiento MRI-147 la cual puede actuar como un intermediario en la transferencia de genes de resistencia a antibióticos, por lo que se puede sobrepasar la barrera del hospedero y participar en el proceso patológico y transferir estos genes a otras cepas que no lo poseen. En tanto a la cepa MRI-151 corresponde a una nueva especie según estudios realizados por mis compañeros del CMEB al realizar las pruebas de susceptibilidad presentó resistencia a P, AM, RA, CC siendo una cepa multidrogoresistente ya que esta cepa puede actuar como intermediario a igual que la MRI-147 en la transferencia de genes de resistencia y participar en el proceso patológico y romper las barreras del hospedero. Tanto la cepa MRI-151 como la MRI-147 fueron sensibles al disco de cefoxitina por lo cual no presentan resistencia homogénea a meticilina, es decir ausencia del gen *mecA*. En la cepa de referencia de Osteomielitis se presentó resistencia a cloranfenicol, pero susceptibilidad a penicilina, ampicilina y meticilina y cefalotina indicando la ausencia del gen *mecA* y de las enzimas β -lactamasas. En este estudio no se utilizó la vancomicina debido a que los aislamientos no presentaron resistencia homogénea o intrínseca mediada por el gen *mecA*.

Resultados de la medición de absorbancia (Concentración de ADN) a 260, 280 y 320 nm de nuestro ADN para su posterior amplificación.

Simple Reads Report

\ par\ f1\ fs16

\ par Collection Time : 16/12/2009 13:30:27

\ par Software Version: 3.0(182)

\ par Instrument: Cary 50

\ par\ fO Result= (-36.0* (Read (280) – Read (320))) + (62.9 * (Read(260) – Read(320))

Nucleic Acid Conc.

Nombre de la muestra	Conc.de ADN en µg/ml.	Coefficiente de AS ₂₆₀ /AS ₂₈₀	Resultados	Abs(280)	Abs(320)	Abs(260)
Zero	1,019 µg/ml	0,97	-----	0,1050	0,0980	0,1028
1	653 µg/ml	1,22	1,3445	0,0076	0,0027	0,0093
2	1,370µg/ml	1,25	1,4049	0,0180	0,0068	0,0225
3	523 µg/ml	1,58	1,7337	0,0056	0,0012	0,0089
4	850 µg/ml	1,2	1,5064	0,0091	0,0053	0,0110
5	653 µg/ml	1,8	2,1690	0,0063	0,0019	0,0114
6	620 µg/ml	1,6	1,7740	0,0062	0,0014	0,0100
7	780 µg/ml	0,42	1,5845	0,0078	0,0103	0,0033
8	790 µg/ml	1,1	1,5549	0,0079	0,0053	0,0094

Cuadro No.11.- Determinación de concentración y pureza del ADN.

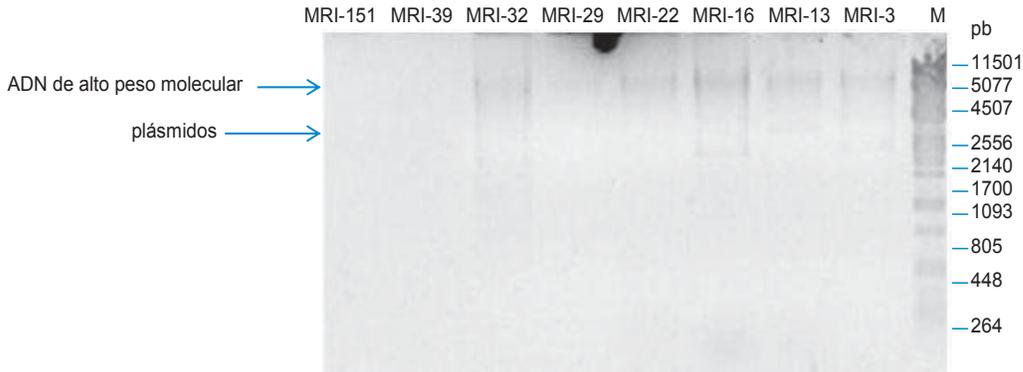


Figura 17.-Extracción de ADN utilizando SDS y Proteinasa K, lisozima, lisostafina y RNAasa. Se observa ADN de alto peso molecular y plásmidos sin la presencia de ribonucleasas.

En el gel de la figura No.17 se observa ADN de alto peso molecular localizado en 11,501 pb y plásmidos en 2443 pb de bases el ADN de estos aislamientos fue tratado con ARNasa en donde podemos observar que nuestro ADN está libre de ribonucleasas en que pueden interferir al momento de realizar la PCR. Los MRI representan ADN de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino, M es el marcador de alto peso molecular.

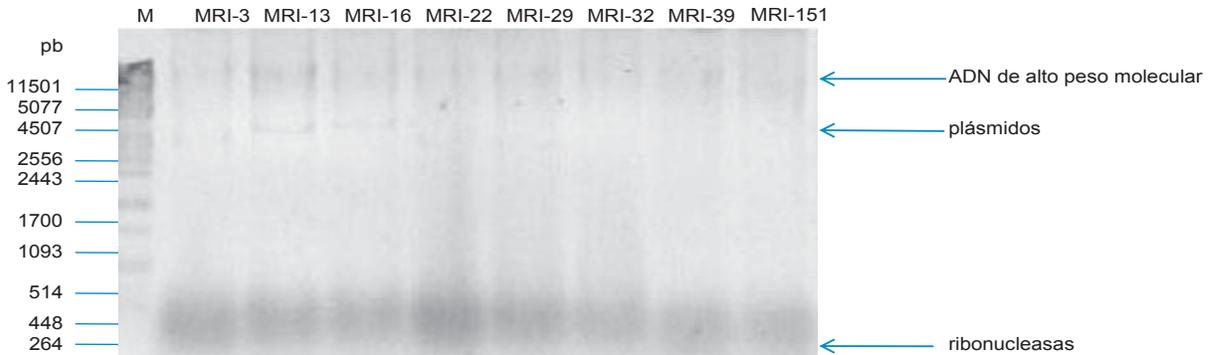


Figura 18.-Extracción de ADN utilizando SDS y Proteinasa K, lisozima, lisostafina sin tratamiento con RNAasa. Se observa DNA de alto peso molecular y plásmidos con la presencia de ribonucleasas.

En el gel de la figura No.18 se observa ADN de alto peso molecular integro localizado en 11,501 pb y plásmidos en 2443 pb se observa la presencia de ribonucleasas en 247 pb debidos a que el ADN no fue tratado con ARNasa. M es el marcador de alto peso molecular y los MRI son ADN de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino más representativos.

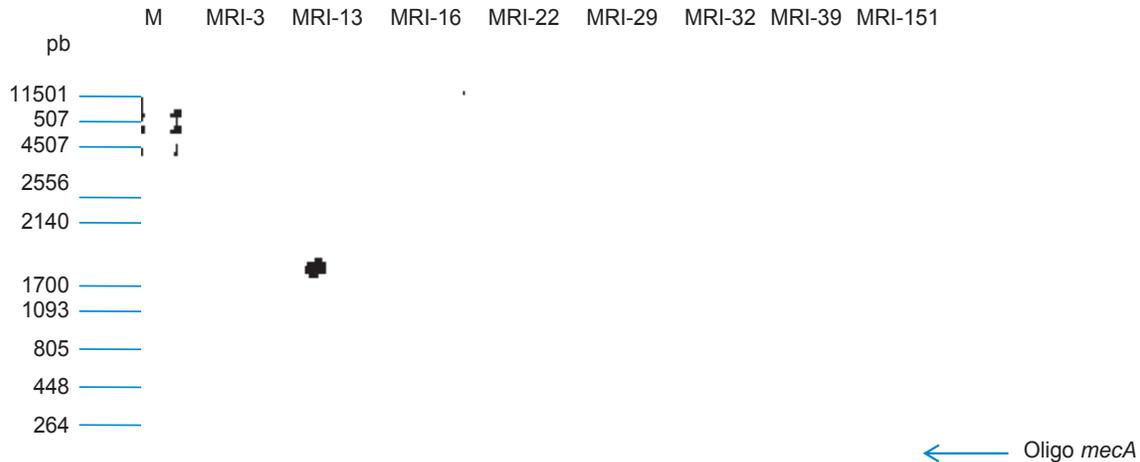


Figura 19.- Ausencia del gen *mecA* y del cassette *SCCmec* y de las recombinasas del *ccrAB* de los aislados de mastitis bovina de las comunidades de Cotzio y Tájaro no se observan productos de PCR puesto que en el antibiograma son sensibles a meticilina.

En el gel de la figura No.19 se observa la ausencia del gen *mecA* de los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino la ausencia de este gen nos indica que no hay cassette de resistencia a meticilina como el *SCCmec* y de las recombinasas del *ccrAB* en este gel se demuestra que el mecanismo de resistencia es otro por lo que demostramos que la resistencia que presentan los aislamientos de *S. aureus* a oxacilina puede ser de tipo borderline puesto que ya se han publicado cepas de *S. aureus* que no tienen gen *mecA* y son resistentes a oxacilina también se habla de resistencia modificada debida a mutaciones en los PBPs 1,3 y 4 y estas cepas son resistentes a oxacilina.

A continuación se presenta el producto amplificado del gen *mecA* utilizando los oligos *mecAp4* y *mecAp7* para demostrar que el oligo si funciona adecuadamente.

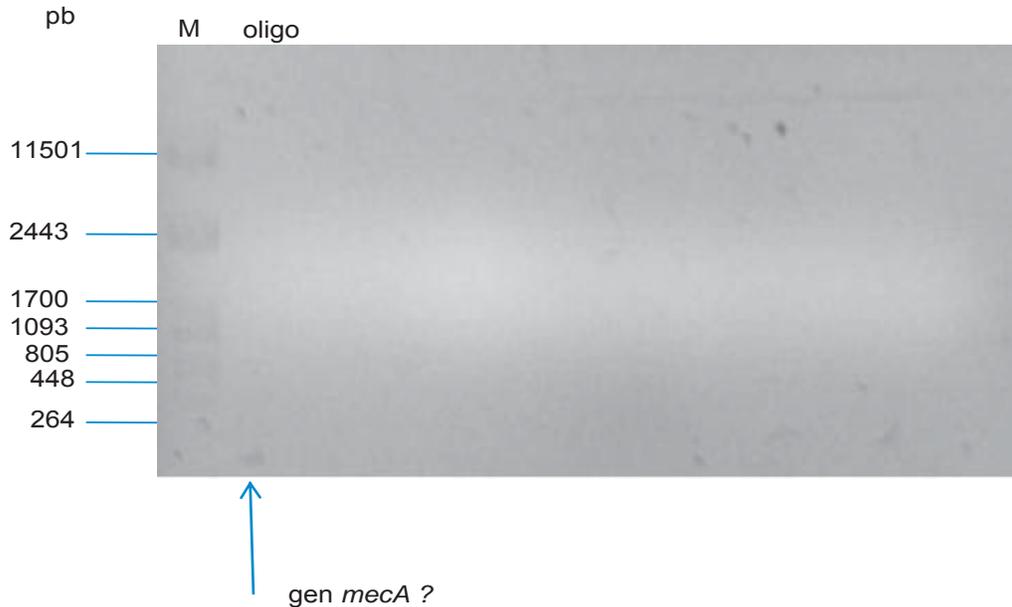


Figura 20 .- Se muestra la amplificación de los oligos *mecAp4* y *mecAp7* donde se muestra el gen *mecA* como producto amplificado de PCR.

En el gel de la figura No.20 se presenta el producto amplificado del gen *mecA* utilizando los oligos *mecAp4* y *mecAp7* el producto amplificado se localiza en 247 pb.

Las cepas fueron amplificadas al azar esto para comprobar que nuestro ADN esta limpio libre de impurezas y que si sale la PCR, los productos de PCR del gen *spa* de la proteína A se localizan en 447 pb aproximadamente. En la figura No.21 se observa la amplificación de la región X del gen de la proteína A membranal de *S. aureus* de los aislamientos de bovinos de las comunidades de Cotzio y Téjaro también se observa un producto doble que corresponde posiblemente a un pseudogen, se realizo este gel para comprobar la calidad del ADN y demostrar la ausencia del gen *mecA*.

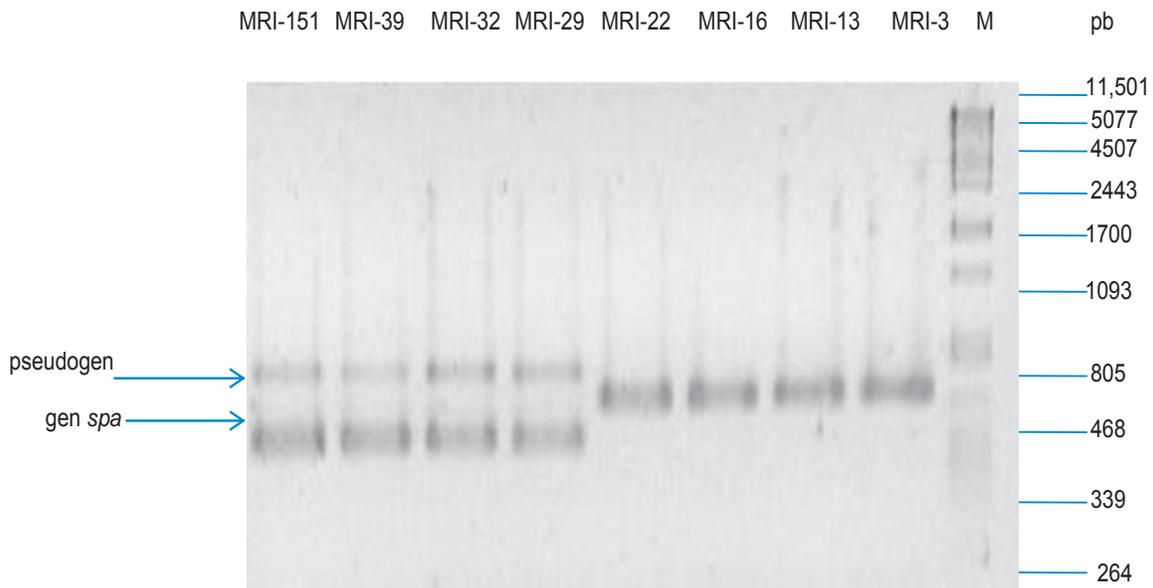


Figura 21.- Amplificación de la región X del gen de la proteína A membranaral de *S. aureus* de los aislados de bovinos nótese un doble producto de un gen que corresponde a un pseudogen y obsérvese los productos de PCR que corresponden a la proteína A.

8.-Discusión:

Este trabajo representa un análisis de susceptibilidad a los antibióticos y detección de resistencia a meticilina (oxacilina) de los aislamientos de *S. aureus* asociados a mastitis bovina en las localidades de Cotzio y Téjaro, Michoacán. Los aislamientos de *S. aureus* presentaron mayor resistencia a los antibióticos β -lactámicos, y un menor grado de resistencia a macrólidos (eritromicina y clindamicina), lincosamidas (linezolid), estreptograminas (quinupristina-dalfopristina) y cefalosporinas (cefalotina). Por lo que se puede establecer que son cepas productoras de las enzimas β -lactamasas, que degradan el anillo β -lactámico de la penicilina, ampicilina y oxacilina, en cambio los mecanismos de las otras resistencias podrían deberse a mutaciones en los ribosomas bacterianos, como las subunidades de 30S y 50S de ARNr o cepas productoras de cefalosporinasas. En este estudio se presentaron los siguientes patrones de resistencia, el primer patrón de resistencia fue a P, AM, presentando un frecuencia

de 28% el segundo patrón resistente a P, AM, Te, presento una frecuencia de resistencia de 10% el tercer patrón resistente P, AM, CC, RA, CF, el cuarto patrón resistente a P, AM, CC, RA y el quinto patrón resistente a P, AM, CC, RA, GM, SYN, CF, ambos patrones presentaron una resistencia del 2% y la de Osteomielitis que fue resistente a C y el resto de los aislamientos que corresponde a un porcentaje de 66% no presentaron resistencia.

A los aislamientos se les realizó la determinación de la CMI de oxacilina siendo los aislamientos de *S. aureus* resistentes a este antibiótico principalmente el MRI-3 y el MRI-12 que en el CMEB reportaron estos aislamientos con un secuenciotipo de ST8 resistentes a meticilina los demás aislamientos resistentes a oxacilina con un secuenciotipo de ST97 se presentan en el cuadro No.9 presentaron resistencia a oxacilina con una CMI mayor a 4 µg/ml. A realizar la PCR a estos aislamientos no se observó producto de amplificación lo que nos indica la ausencia del gen *mecA*, por lo que optamos en utilizar el disco de cefoxitina para descartar la resistencia verdadera o homogénea mediada por el gen *mecA*, ya que in vitro se ha demostrado que las cefamicinas inducen la producción de PBP2A codificada por el gen *mecA*, presentando los aislamientos de *S. aureus* sensibles a este antibiótico descartando la resistencia homogénea o verdadera por el gen *mecA*, de los aislamientos de *S. aureus* de las comunidades de Cotzio y Téjaro. En la literatura se menciona que los ST8 de origen humano de cepas adquiridas en la comunidad presentan resistencia a meticilina pero mediada por el gen *mecA*, en este estudio los aislamientos son resistentes a oxacilina, pero no presentan el gen *mecA*, en la literatura se menciona de cepas de *S. aureus* que presentan resistencia a oxacilina pero sin la presencia del gen *mecA*, se dice que son cepas que presentan una resistencia limítrofe o modificada debida a la hiperproducción de β-lactamasas o mutaciones en los PBPs 1, 3 y 4 estas cepas son conocidas de tipo borderline es decir de resistencia heterogénea o limítrofe mediada por otros mecanismos de resistencia por lo que se puede explicar las resistencia que presentaron a oxacilina los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino. En el CMEB los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino presentaron los siguientes secuenciotipos, ST97 y ST8,

ST97 comúnmente se asocia a aislamiento de origen bovino, mientras que ST8 se asocia a aislados de origen humano, de infecciones adquiridas en la comunidad, resistente a meticilina. Este hallazgo resalta el potencial zoonótico de *S. aureus*, ya que los aislamientos del ST8 aislados de bovino pueden derivar de cepas de humanos y representar un reservorio para las infecciones adquiridas en la comunidad. En este trabajo se buscó la resistencia de meticilina de los ST8, siendo los ST8 sensible a meticilina por que todavía no se han expresado los genes de resistencia como el gen *mecA* siendo los ST8 y ST97 sensibles a meticilina, ya que comparten el mismo nicho ecológico y representan una fuente potencial de transferencia horizontal de genes de virulencia, patogenicidad y resistencia a antibióticos, por lo que se rechaza la hipótesis ST8 resistente a meticilina. Al observar el árbol filogenético, la secuencia MRI-151 se muestra separada de las demás secuencias. A nivel microbiológico se identificó como *S. aureus*, pero a nivel de secuenciación se mostró con diferencias colocándolo dentro del género *Staphylococcus*, pero con una rama separada, por lo cual sugiere que corresponde a una nueva especie, según lo reportado en el CMEB, pero al hacer el antibiograma resultó ser resistente a penicilina, ampicilina, clindamicina y rifampicina pero sensible a meticilina por lo que corresponde a una cepa multidrogoresistente; esta cepa puede actuar como intermediario en la transferencia horizontal de genes para así sobrepasar las barreras del huésped y participar en el proceso patológico y transferir genes de resistencia a otras cepas de aislados de *S. aureus* de origen bovino. Sin embargo posee otros mecanismos de resistencia diferentes a los del gen *mecA*, lo cual se establece la ausencia del cassette *SCCmec* y de las recombinasas del *ccrAB* y del gen *mecA* en el aislado MRI-151.

9.- Conclusiones:

En nuestro laboratorio se describieron las poblaciones del ST97 y ST8, que comparten el mismo nicho ecológico y que representan una fuente potencial de transferencia de genes de virulencia, patogenicidad y resistencia a antibióticos. La

identificación del gen *mecA* sugiere la presencia del cassette del *SCC-mec* y de las recombinasas del “*ccrAB*” en los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino. La identificación de los alotipos del *ccrAB* y del cassette de *SCCmec* permitirá establecer la presencia del gen *mecA*, así como el potencial de transferencia horizontal de genes entre cepas de humanos y de animales de los aislamientos de SARM. Y la cepa MRI-151 que es sensible a meticilina y resistente a penicilina, ampicilina, clindamicina y rifampicina que corresponde filogenéticamente a una nueva especie del género *Staphylococcus* el cual fue identificada como *S.aureus* con métodos microbiológicos tradicionales pero que al hacer el análisis de secuencia resulto ser otra especie diferente pero sensible a meticilina lo que nos indica que esta cepa no posee el gen *mecA* lo que establece la ausencia del cassette *SCCmec* y de las recombinasas del *ccrAB* en esta nueva especie por lo que es necesario realizar los métodos moleculares para su caracterización para conocer el poder patogénico y de transferencia horizontal de genes de esta nueva especie.

10.- Bibliografía:

- 1.- Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud Publica. Mex 2005., 47: 381-387.**
- 2. - Cheung A.L. 2001. Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* In: Honeyman A.L., Friedman H., Bendinelli M. (eds.), *Staphylococcus aureus* infection and disease. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Pp 295-322.**
- 3.-Valdez-Alarcon y col. Epidemiología molecular de la mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus* en granjas familiares en las poblaciones de Cotzio y Tejaro, Michoacán. CMEB, Sin páginas.**
- 4.-Bustos-Martinez J.A., Hamdan-Partida A., Gutierrez-Cardenas M.2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev.Biomed. 17: 287-305.**

- 5.-Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of Community and health care-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 2003., 290: 2976-2984.
- 6.- Said-Salim B, Mathema B, Kreiswirth BN. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003., 24:451-455.
- 7.- Charlebois ED, Bangsberg DR, Moss NJ, Moore MR, Moss AR, Chambers HF, Perdreau-Remington F. Population-based community prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the urban poor of San Francisco. *Clin Infect Dis* 2002., 34: 425-433.
- 8.- Shukla SK. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its emerging virulence. *Clin Med Res* 2005., 3:57-60.
- 9.- Graham PL, Lin SX, Larson EL. A U.S. Population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Ann Intern Med* 2006., 144: 318-325.
- 10.- Weber TJ. Community-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2005., 41: 269-272.
- 11.- Shukla SK. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its emerging virulence. *Clin Med Res* 2005., 3:57-60.
- 12.-Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemoter* 2004., 48: 2637-2651.
- 13.- Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains *Antimicro Agents Chemother* 2002., 46: 1147-1152.
- 14.-Enright MC, Ashley AD, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2006: 99: 7687-7692.

- 15.- Kuehnert MJ, Kruzon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et al. Prevalence of Staphylococcus aureus nasal colonization in the United States, 2001-2002. J Infect Dis 2006., 193: 172-179.
- 16.- Ponce de León S, Rangel-Frausto M, Elias-López JI, Romero-Oliveros C, Huertas-Jiménez M. Infecciones nosocomiales: tendencias seculares de un programa de control en México. Salud Pública Méx. 1999., 41: 5-11.
- 17.- Tapia CR. Infecciones nosocomiales. Salud Pública Méx. 1999., 41: 12-17.
- 18.- Fridkin SK, Gaynes RP. Antimicrobial resistance in intensive care units. Clin Chest Med 1999., 20: 303-316.
- 19.- Díaz Ramos RD, Solórzano Santos F, Padilla Barrón G, Miranda Novales MG, Gonzales Robledo R, Trejo y Pérez JA. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. Salud Pública Méx. 1999., 41: 12-17.
- 20.-Avila Figueroa C, Casta Cruz M, Aranda Patrón E, León RA, Justiniano N, Pérez Ricardez L, et al. Prevalencia de infecciones nosocomiales en niños: encuesta de 21 hospitales en México. Salud Publica Mex 1999., 41: 18-25.
- 21.-Leonard F.C., Markey B.K. 2008. Staphylococcus aureus in animals: a review. Vet. J. 175: 27-36.
- 22.-Walther B., Wieler L.H., Friedrich A.W., Hanssen A.M., Kohn B., Brunenberg L, Lubke. Becker A. 2008. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. Vet. Microbiol. 127: 171-178.
- 23.-Malik S., Coombs G.W., O'Brien F.G., Peng H., Barton M.D. 2006. Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from cats and dogs. J. Antimicrob. Chemother. 58: 428-431.
- 24.-Cuny C., Kuemerle J., Stanek C., Willey B., Strommenger B., Witte W. Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterization and comparison with MRSA from humans.

25.- Ávila TS, Cano CP, Ávila GJ, Trejo RL y Olguin BA: Mastitis y Glándulas improductivas. Memorias del XX Congreso Nacional de Buiatria. Acapulco Gro. México, 1996., 2: 175.

26.- Trejo RL, Ávila TS y Cano CP: Eficiencia del tratamiento al secado de vacas con tilmicosina., Tesis de licenciatura FMVZ. UNAM. 1996.

27.- Boletín de Leche. Junio de 2008. Sistema Integral de Información Agroalimentario y Pesquero (SIAP)., Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (en línea: <http://www.siea.sagarpa.gob.mx>).

28.- Ávila T.S., Gutiérrez C.A.J., Sánchez G.J.I., Canizal J.E.Torres V.S. 2001. Prevalencia de la mastitis y glándulas improductivas en hatos pequeños en la cuenca de Xochimilco, D.F. Memorias del III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. 21 al 23 de Junio, León, Guanajuato, México.

29.- Manzano C.C., Salguero L.G., López B.B., Soto C.R.2004. Resultados del empleo de una bacterina contra *S. aureus* en un brote de mastitis en un establo del CAIT. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatria. Morelia, Michoacán.

30.-Luque A.M.A., Gaxiola C.S.M. 1993. Prevalencia, etiología y sensibilidad antimicrobiana de mastitis subclinica en Culiacán, Sinaloa. Memorias de la XXIV Reunión de la A.M.P.A., Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chihuahua.

31.- El-Sayed A., Alber J., Lammler C., Jager S., Wolter W., Castañeda-Vasquez H. 2006. Comparative study on genotypic proprieties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. *Vet. Mex.* 37: 165-179.

32.- Franco G.J.C., Gonzalez V.L., Gomez M.S.C., Carrillo G.J.M., Ramirez C.J.J. 2008. Virulence factors analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Mexico. *e-Gnosis.*, Revista digital científica y tecnológica. www.e-gnosis.udg.mx(En prensa).

- 33.- Solorio-Rivera JL, Rodríguez-Vivas RI, Pérez-Gutiérrez E, Wagner G. 1999. Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern, Yucatan, Mexico. *Prev. Vet Med.* 40: 261-269.
- 34.- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Kapur, V., 1997. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* 119: 261-269.
- 35.-Highlander S.K., Hulten K.G., Qin X., et al., 2007. Subtle genetic changes enhance virulence in methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 7:99 doi: 10.1186/ 1471-2180.
- 36.- Lindsay J.A., Holden M.T.G. 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct. Integr. Genomics.* 6: 186-201.
- 37.- Sung y col., 2008. Microarrays Reveal that Each of the Ten Dominant Lineages of *Staphylococcus aureus* Has a Unique Combination of Surface-Associated and Regulatory Genes. 2: 669-675.
- 38.- O'Hara F.P., Guex N., Word J.M., Miller L.A., Becker J.A., Walsh S.L., Scangarella N.E., West J.W., Shawar R.M., Amrine-Madsen H. 2008. A geographic variant of the *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin toxin and the origin of the community-associated methicillin-resistant *S.aureus* USA300. *J. Infect. Dis.* 197: 187-194.
- 39.- Dumitrescu O., Tristan A., Meugnier H., Bes M., Gouy M., Etienne J., Lina G., Vandenesch F.2008. Polimorphism of the *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin genes and its posible link with the fitness of community-associated methicillin-resistant *S.aureus*. *J.Inf.Dis.* 198: 792-793.
- 40.-
- 41.-Marcos Vivoni A, Meurer Moreira B. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005., 100: 693-698.
- 42.- Aires de Sousa M, Miragaia M, Santos SI, Avila S, Adamson I, Casagrande ST, et al. Three-Year assessment of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus clones in Latin America from 1996 to 1998. J Clin Microbiol 2001., 39: 2197-2205.

43.- Enright MC, Ashley AD, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99: 7687-7692.

44.- Mendoza CT et al. Staphylococcus aureus metilino- resistente (MRSA): colonización y susceptibilidad en pacientes y personal de salud de un hospital de referencia. Disponible en Internet: <http://www.fihudiagnostico.org.pe/revista/numeros/2001/mayjun01/149-156.html>.

45.- Durenberg, R.H., Vink, C., Kanelic, S., Friedrich, A.W., Bruggeman, C., and Stobberingh, E.E. 2006. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol.Infect. 13: 222-235.

46.- Ang, J., Erize, E., Asmar, I. 2004. Antibacterial Resistance. Indian J Ped. 71: 229-239.

47.- Schito, G.C. 2006. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol.Infect. 12: 3-8.

48.- Werckenthin, C., Cardoso, M., Martel, J.L., Schwarz, S.2001. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. Vet. Res.32: 341-362.

49.-Salmenlinna, S.2002. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. National Public Health Institute. DC: 14-30.

50.-Snyder, L., Champnes, W. 1997. Antibiotics That Block Transcription and Translation. In Molecular Genetics of Bacteria. First Edition. Pp. 67-69.

51.- Appelbaum, P.C.2006. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. 12: 16-23.

- 52.- Feng Y., Chen C-J., Su L-H., Hu S., Yu J., Chiu C-H. 2008. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol.Rev.* 32: 23-37.
- 53.- Lindsay J.A., Holden M.T.G. 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct. Integr. Genomics.* 6: 186-201.
- 54.- Lindsay J.A., Moore C.E., Day N.P., Peacock S.J., Witney A.A., Stabler R.A., Husain S.A., Butcher P.D., Hinds J. 2006. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J. Bacteriol.* 188: 669-676.
- 55.- Cavalieri, S.J., Coyle, M.B. 2005. Modos y Mecanismos. In *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Library of Congress Cataloging. Pp: 3-15.
- 56.- Cooke E.M., Casewell M.W., Emmerson A.M., Gaston M., de Saxe M., Mavon-White R.T., Galbraith N.S. 1986. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the UK and Ireland. *J. Hosp. Infect.* 8: 143-148.
- 57.-Panlilio A.L., Culvert D.H., Gaynes R.P., Banerjee S., Henderson T.S., Tolson J.S., Martone W.J., 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975-1991. *Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.* 13: 582-586.
- 58.- de Lencastre H., Oliveira D., Tomasz A. 2007. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 428-435.
- 59.-Robinson, D.A., Enright, M.C. 2003. Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3926-3934.
- 60.- Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. 2000. New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. 44: 1549-1555.

- 61.- Oliveira, D.C., Tomasz, A., de Lencastre, H. 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet. Infect. Dis.* 2: 180-189.
- 62.- Ito y col. 2009. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec(SCCmec)*: Guidelines for Reporting Novel *SSCmec* Elements. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2009. p. 4961-4967.
- 63.- CLSI(Clinical Laboratory Standardization Institute). Antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement. Document M100/S16 Vol: 27 No.1, 2007., Pp: 46-49.
- 64.- Sakoulas G, Gold L, Venkataraman L, Degirolami P, Eliopoulos G, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J.Clin. Microbiol.* 2001. 39: 3946-3951.
- 65.-Okonogi K, Nogi Y, Kondo M, Imada A, Yokota T. Emergence of methicillin-resistant clones from cephamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J.Antimicrob.Chemother.* 1989. 24: 637-645.
- 66.- Ulloa M, Porte L, Carmi A, Varela C, Fica A. Comparación de reacción de polimerasa en cadena, látex y antibiograma para detección de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente. *Rev. Chil. Infec.* 2001. 18: 255-260.
- 67.-Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J.Clin.Pathol.* 1966. 45: 439-496.