

Instituto Nacional  
de Salud Pública

## **Escuela de Salud Pública de México**

**Identificación de genotipos capsulares de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) en aislamientos mexicanos**

# **T E S I S**

Que para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en  
Enfermedades Infecciosas**

**Presenta:**

M.C. Brian Rodríguez Arvizu

**Comité de tesis:**

Directora de tesis: Dra. María Elena Velazquez Meza

Asesor 1: Dra. Patricia Cornejo Juárez

Asesor 2: M. en C. María Noemí Carnalla Barajas

Lector: Dr. Rodolfo Gatica Marquina

Cuernavaca, Morelos

Agosto, 2014

## Índice

Resumen.....	2
Introducción.....	3
Generalidades.....	4
Epidemiología e historia de la resistencia de los MRSA.....	4
Adquisición de genes de resistencia.....	6
Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> .....	7
Vías propuestas para la biosíntesis de CP5 y CP8.....	8
Clonalidad de MRSA.....	13
Justificación.....	15
Pregunta de investigación.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivo general.....	16
Objetivo particular.....	16
Mapa conceptual.....	16
Metodología.....	17
Población de estudio.....	17
Crecimiento bacteriano y extracción de DNA.....	18
Condiciones de amplificación por PCR.....	19
Preparación de discos de DNA para PFGE.....	19
Restricción de discos de DNA para PFGE.....	20
Condiciones de corrida para PFGE.....	20
Consideraciones éticas.....	21
Consideraciones de bioseguridad.....	21
Resultados.....	22
Discusión.....	27
Conclusiones.....	30
Limitaciones.....	31
Perspectivas.....	31
Agradecimientos.....	32
Referencias bibliográficas.....	33
Anexos.....	36

## Identificación de genotipos capsulares de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) en aislamientos mexicanos

### Resumen

Debido al incremento en las infecciones ocasionadas por *Staphylococcus aureus*, actualmente se generan gastos elevados en la atención médica de estos padecimientos, así como elevadas tasas de morbi-mortalidad. Los polisacáridos capsulares (CP) que *S. aureus* posee, impiden la acción de los neutrófilos sobre la bacteria, promueven la adherencia a células y dispositivos protésicos, además de que retrasan la quimiotaxis y fagocitosis. Se han clasificado 11 tipos de CP en *S. aureus* y se ha visto que los tipos CP5 y CP8 se encuentran presentes en un 70 a 80% de las cepas de importancia clínica.

Se analizaron 52 cepas de MRSA del período 1997-2006 y 210 cepas de MRSA correspondientes al período 2007-2012. Los aislamientos fueron analizados por PCR para la identificación de los genotipos capsulares *cap5* y *cap8* y por electroforesis de campos pulsados (PFGE) para la determinación del patrón clonal.

En el análisis de frecuencia de los genotipos capsulares se observó que de las 262 cepas de *S. aureus* estudiadas, 245 (93.5%) portaron el gen que codifica para *cap5* y solo 17 cepas (6.5%) tuvieron el gen de *cap8*. Cuando se relacionó el origen clonal y la expresión del genotipo capsular en las cepas de MRSA analizadas, se observó que las cepas de MRSA descendientes de la clona epidémica EMRSA16 presentaron el gen de *cap8*; mientras que las cepas de MRSA descendientes de las clonas: Ibérica, Nueva York/Japón y USA300 amplificaron el gen específico para *cap5*.

La identificación de los genotipos capsulares de MRSA, resulta una información relevante debido a que las posibles formulaciones de vacunas contra *S. aureus* consideran la inclusión de polisacáridos capsulares como componentes de las mismas.

## Introducción

En la actualidad, las infecciones nosocomiales (IN) representan un problema de salud global, tanto por el incremento en su incidencia, como por el incremento en la morbi-mortalidad. Particularmente las infecciones nosocomiales ocasionadas por cepas de *Staphylococcus aureus* tienen gran relevancia debido a la variedad de padecimientos que son producidos por este microorganismo, como son: osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica, septicemia, infecciones a nivel del sistema nervioso central, sistema respiratorio y vías urinarias, entre otras.<sup>1</sup>

De acuerdo a las consideraciones de la Organización Mundial de la Salud una IN es aquella que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internamiento (>48 hrs de estancia), además de que comprende las infecciones adquiridas en el hospital, pero que se manifiestan después del alta hospitalaria y, aquellas ocupacionales del personal de salud.<sup>2</sup>

En el 2011 el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, publicó un estudio realizado para revelar la prevalencia de IN en hospitales generales de las principales instituciones de salud. En este estudio se incluyeron 54 hospitales (20 catalogados como Hospitales Generales de Zona del IMSS, 20 Hospitales Generales operados por los Servicios Estatales de Salud, y 14 del ISSSTE catalogados como Hospitales Generales o Regionales) con una muestra total de 4,274 pacientes. Se identificaron las principales IN encabezando la lista las neumonías (33.2%), seguida por infecciones de vías urinarias (24.6%), otras no especificadas (17.7%), infecciones de heridas quirúrgicas (15.5%), bacteriemia primaria (5.8%) e infecciones de órganos y espacios (3.2%).<sup>3</sup> Los microorganismos identificados en estas IN fueron: *Enterobacter sp.* (38%), *S. aureus* (13%), *Pseudomonas sp.* (13%), otros no especificados (10%), estafilococos coagulasa negativos (8%), *Acinetobacter sp.* (7%), *Enterococcus sp.* (6%) y *Candida sp.* (5%). Destacando que *S. aureus* fue el segundo agente causal de infecciones nosocomiales en los hospitales estudiados.<sup>3</sup>

## Generalidades

*Staphylococcus aureus* pertenecen a la familia *Micrococaceae* del género *Staphylococcus* del cual hay más de 30 especies. Fueron descritos por primera vez en 1880 por el médico cirujano Sir Alexander Ogston cuando observaba al microscopio la secreción pustulosa drenada de los abscesos de sus pacientes. En ese momento los nombró “*staphyle*” por la semejanza que tienen con un racimo de uvas. Son cocos Gram positivos considerados como parte de la flora normal, que miden 1µm de diámetro, forman colonias de entre 1 y 3 mm de diámetro. Son bacterias no móviles, anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa, no esporulados, catalasa positivo; dentro de los estafilococos son la única especie coagulasa positivo, se consideran halófilos por su afinidad a medios hasta 15% de concentración de NaCl; una característica particular es la pigmentación amarilla que producen debida a los carotenoides; crecen de manera óptima en un pH de 7.0-7.5 pero hay registro de crecimiento en pH de ambos extremos y a temperaturas que van de los 25 hasta los 43°C.<sup>4</sup>

### **Epidemiología e historia de la resistencia de los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA)**

En los Estados Unidos, *S. aureus* ocupó el segundo lugar como causa de bacteriemia adquirida en el hospital.<sup>5</sup> En México la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad en pacientes infectados con *S. aureus* variaban entre 5 a 70%, además de que entre 1998 y 2003 ocupó el tercer lugar en morbilidad y cuarto en mortalidad.<sup>6</sup>

El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNIS) de los Estados Unidos, determinó que en pacientes hospitalizados, la prevalencia de cepas de MRSA incrementó de 4% en 1980 hasta un 80% para el 2004, mientras que en países como Italia, Portugal y Japón las prevalencias fueron de 58, 54 y

70% respectivamente, de manera evidente en los países escandinavos estas prevalencias apenas alcanzan el 1%.<sup>7</sup> Diversos estudios en América Latina indican porcentajes importantes de IN por MRSA que van de 6 a 85%.<sup>8</sup> Todo esto nos hace reflexionar sobre las políticas de salud que se aplican en dichos países y nos obliga a aprender sobre el buen uso y restricción de los antibióticos que se ejerce en los países nórdicos.

En 1997 el número de casos de pacientes hospitalizados por infecciones causadas por MRSA en Estados Unidos era de 150 por año. Diez años después, se reportaron más de 4,500 casos por año en ese país, ejemplificando con este incremento el crecimiento exponencial al que se tienen que enfrentar ahora los sistemas de salud.<sup>9</sup> Actualmente se tienen datos de que en 2011 solo en Estados Unidos, el número de muertes anuales en pacientes hospitalizados con infecciones por MRSA ascendió a 18,650 defunciones.<sup>10</sup>

Los costos hospitalarios de IN causados por MRSA varían dependiendo del país, pero afectan de manera similar el presupuesto destinado al rubro en salud. Por ejemplo, en Canadá el costo hospitalario de IN por paciente con infección por MRSA fue de 12 mil USD, con un costo anual estimado de 129 millones de USD en el 2010 y una estancia hospitalaria promedio de 26 días.<sup>11</sup> En Estados Unidos entre 2000 y 2001, el costo promedio por hospitalización por cada paciente con infección con MRSA fue de 48 mil USD, comparado con 14 mil USD en pacientes que no presentaron infección por este germen.<sup>7</sup> Mientras que en el Hospital Civil de Guadalajara el costo de IN por paciente en el 2010 fue de 234 mil pesos, con un costo anual estimado de 76.28 millones de pesos en una estancia hospitalaria promedio de 26 días.<sup>12</sup>

Antes de la introducción de los antibióticos en el año de 1940, las bacteriemias causadas por *S. aureus* tenían una mortalidad aproximada de 82%. Para 1996, aun con todos los antimicrobianos disponibles en esa época, la mortalidad se reportaba entre 25 y 63%.<sup>13</sup> La evolución de la resistencia de los MRSA siempre ha sido de manera inmediata después de la introducción de diferentes antibióticos.

En el año de 1940 se comenzó a utilizar la penicilina para infecciones contra *S. aureus*, e inmediatamente un año después ya se tenían reportes de cepas resistentes a estos antibióticos. Cinco años más tarde, en 1946, 60% de los aislamientos en Inglaterra eran resistentes a las penicilinas; dicha resistencia actualmente oscila entre 80 y 93%, para el año de 1957 se dieron los primeros reportes de aislamientos multiresistentes. En 1959 en Europa se introdujeron las cefalosporinas y penicilinas semisintéticas conocidas como meticilinas, y como era de esperarse, en 1960 ya se tenía resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles incluyendo meticilina. Pero fue en el año de 1963, cuando se reportó el primer brote a nivel hospitalario causado por MRSA, actualmente estos brotes nosocomiales son reportados en todo el mundo.<sup>1</sup>

### **Adquisición de genes de resistencia**

La resistencia bacteriana de *S. aureus* se encuentra mediada por diferentes mecanismos, dos de los más importantes son la producción de beta-lactamasas y la modificación al sitio blanco. Las beta-lactamasas son enzimas producidas por algunas bacterias, actúan hidrolizando la unión peptídica endocíclica del anillo beta-lactámico; se han descrito más de 200 diferentes beta-lactamasas, algunas son específicas contra un antibiótico en particular, y otras son de espectro extendido.<sup>14</sup>

La resistencia por modificación del sitio blanco implica una serie de procesos evolutivos que son heredados o adquiridos entre las especies. Actualmente las cepas de *S. aureus* poseen alto grado de resistencia a los antibióticos debido al intercambio horizontal de genes que son transportados por plásmidos, transposones (Tn) y/o secuencias de inserción (IS). El elemento central de la resistencia a la meticilina en *S. aureus* es la adquisición del gen *mecA*, localizado en el casete cromosomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*). *mecA* codifica para una proteína de unión a la penicilina de 78 kDa (PBP2a) la cual presenta una baja afinidad para la meticilina y para el resto de los  $\beta$ -lactámicos, lo que permite que

PBP2a continúe sintetizando el peptidoglicano para la formación de la pared celular.<sup>15</sup>

Se ha observado que la transferencia del gen *mec* solo es llevada de manera horizontal, además de que se tiene la evidencia de que el gen *mecA* desciende de un antepasado común (*mecA* de *Staphylococcus sciuri*) con el que guarda una homología de casi el 89%, a manera de que este antepasado puede ser el precursor evolutivo del gen estructural de la PBP2a.<sup>16</sup>

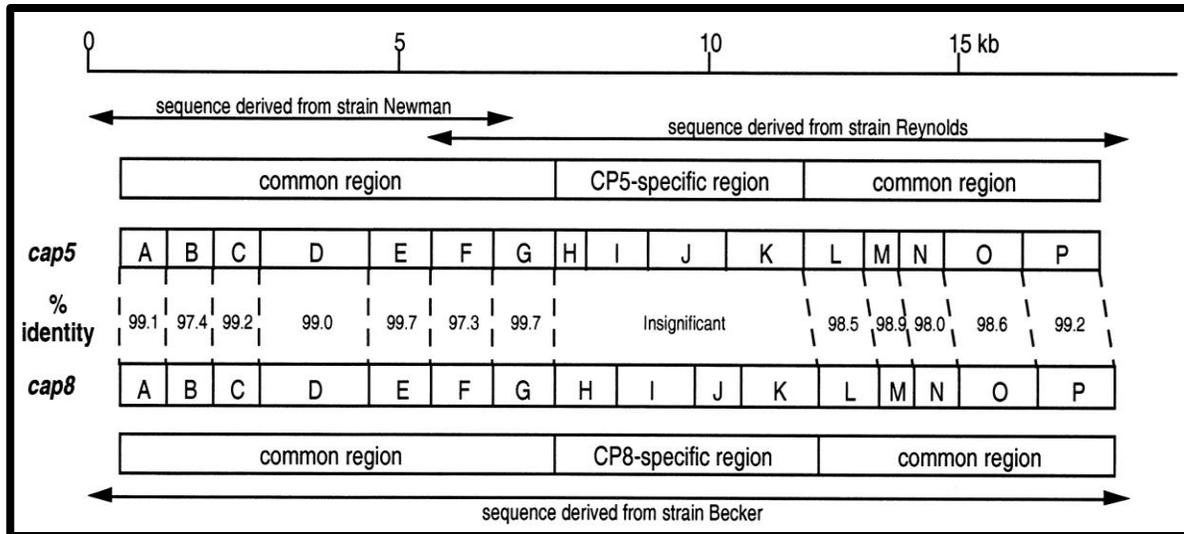
### **Factores de virulencia de *S. aureus***

*S. aureus* produce una gran variedad de proteínas que le confieren la virulencia que lo caracteriza, dentro de ellas se encuentran las de adhesión como los ácidos teicoicos, la coagulasa, colagenasa, entre otras; las de penetración a los tejidos del huésped como las proteasas, estafilocinasas y sus diferentes hemolisinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), y las que le confieren la capacidad de invasión por los mecanismos inhibitorios de las defensas del huésped como el peptidoglicano, la proteína A, los polisacáridos capsulares, las enzimas catalasa, hialuronidasa y lipasa, entre otras.<sup>17</sup>

Dentro de los factores de virulencia estructurales, está demostrado que los polisacáridos capsulares (CP) impiden la acción de los neutrófilos sobre la bacteria, promueven la adherencia a células y dispositivos protésicos, además de que retrasan la quimiotaxis y fagocitosis. Se han clasificado 11 tipos de CP en *S. aureus* y se ha visto que los tipos CP5 y CP8 se encuentran presentes en un 70 a 80% de las cepas de importancia clínica.<sup>18</sup>

Los genes *cap5* y *cap8* los cuales codifican para los polisacáridos CP5 y CP8 respectivamente, pesan poco más de 15kb, se encuentran conformados por tres regiones de las cuales dos son consideradas comunes y estas flanquean una región específica de cada CP. Estas tres regiones se encuentran divididas a la vez por 16 diferentes genes que van del *cap5A* al *cap5P* para CP5 y del *cap8A* al

*cap8P* para CP8, y solo los que se encuentran en la región específica difieren en homología comparados con aquellos de las regiones comunes que entre *cap5* y *cap8* guardan una homología mayor al 97% (Figura 1).<sup>18</sup>



**Figura 1.** Tomada de: Katherine O’Riordan, Jean C. Lee. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clinical Microbiology reviews, Jan. 2004.

### Vías propuestas para la biosíntesis de CP5 y CP8

Para llevar a cabo la síntesis de CP5 y CP8 es necesaria la acción de diversas enzimas las cuales son codificadas por los diferentes genes que se encuentran en *cap5* y *cap8*, estas enzimas tendrán la función de ejercer diferentes cambios de tipo conformacional y molecular a un azúcar, el cual a lo largo del proceso de síntesis sufrirá modificaciones que le permitirán generar al final tres azúcares diferentes que serán las precursoras de la formación de los diferentes CP.

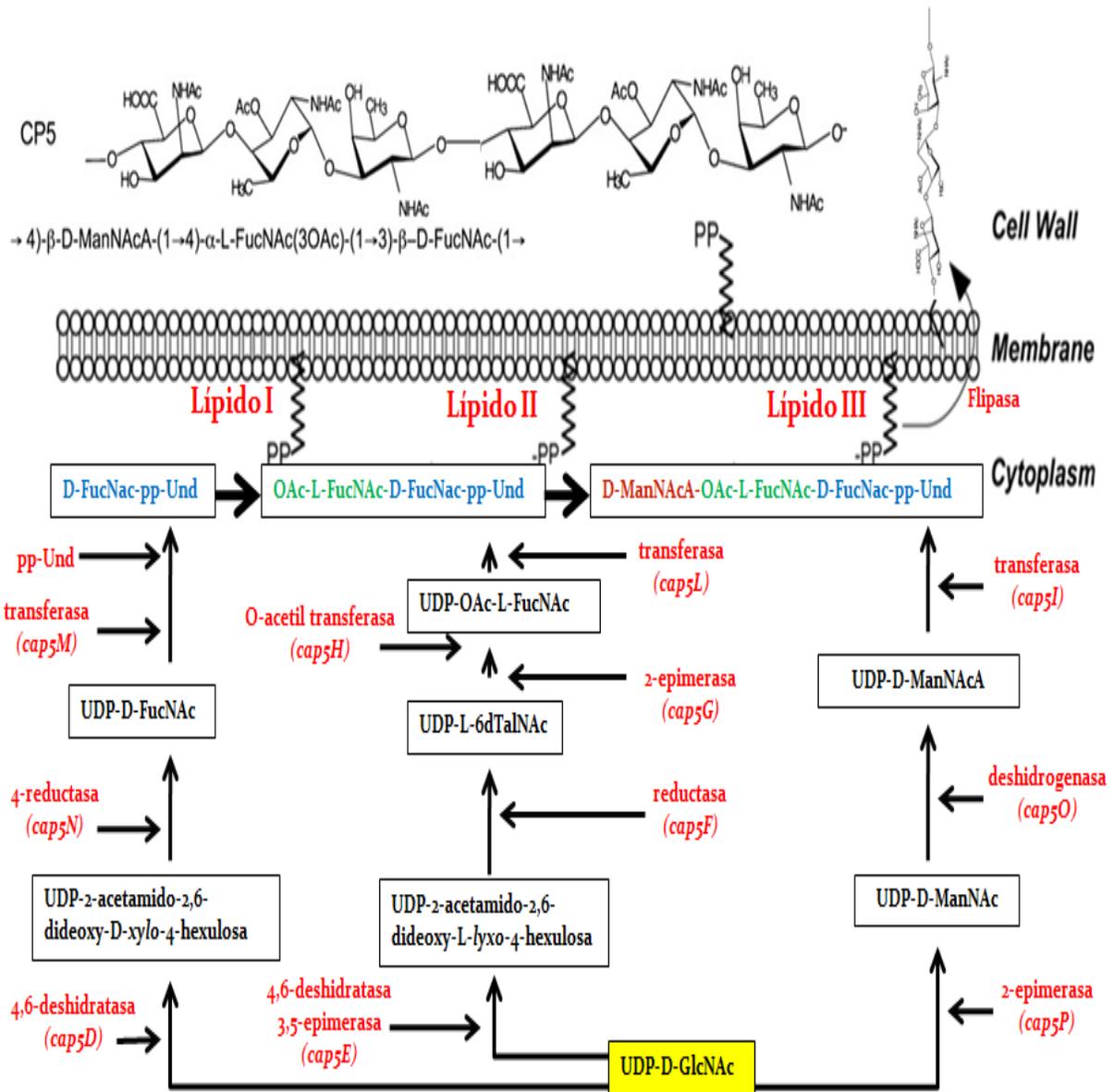
El proceso de síntesis de CP8, se origina a partir del azúcar uridin difosfato-N-Acetil-D-glucosamina (UDP-D-GlcNAc), este será sometido a tres vías distintas para la generación de tres azúcares finales: N-Acetil-D-Acido Manosaminurónico (D-ManNAcA), N-Acetil-L-fucosamina (L-FucNAc) y N-Acetil-D-fucosamina (D-FucNAc). En la primera vía, la enzima 4-epimerasa codificada por el gen *cap8D* realizará un cambio de carbono en la posición 4 del epímero del azúcar UDP-D-GlcNAc y la convertirá en uridin difosfato-N-Acetil-D-galactosamina (UDP-D-

GalNAc), posteriormente la 6-deshidratasa codificada por *cap8E* restará elementos de agua para generar el azúcar uridin difosfato-N-Acetil-D-fucosamina (UDP-D-FucNAc), esta última perderá sus grupos fosfato por la acción de una transferasa codificada por el gen *cap8M* generando el azúcar N-Acetil-D-fucosamina (D-FucNAc) a quien se le agregará una molécula acarreadora de lípidos denominada undecaprenol pirofosfato (pp-Und) la cual se encargará de transportar a los azúcares a través de la membrana citoplasmática al final de la síntesis, de esta manera se forma el primer precursor del CP8, N-Acetil-D-fucosamina-Undecaprenol pirofosfato (D-FucNAc-pp-Und). Tanto la segunda como la tercera vía iniciarán a partir de un azúcar secundario uridin difosfato-N-Acetil-D-manosamina (UDP-D-ManNAc) generado del cambio del carbono en la posición 2 del epímero de UDP-D-GlcNAc por la 2-epimerasa (*cap8P*). En la segunda vía UDP-D-ManNAc cambia la posición del carbono 3 del epímero por la 3-epimerasa (*cap8N*) para generar uridin difosfato-N-Acetil-L-galactosamina (UDP-L-GalNAc), quien perderá agua debido a la 6-desidratasa (*cap8F*) y originará uridin difosfato-N-Acetil-L-fucosamina (UDP-L-FucNAc), para posteriormente perder sus grupos fosfato por la acción de la transferasa (*cap8L*) e integrarse al primer precursor como N-Acetil-L-fucosamina (L-FucNAc); (L-FucNAc- D-FucNAc-pp-Und). La última vía, que también inicia a partir de UDP-D-ManNAc recibe la acción de la 6-deshidrogenasa (*cap8O*) y se transforma en uridin difosfato-N-Acetil-D-Acido Manosaminurónico (UDP-D-ManNAcA), a este último azúcar se le transferirá un grupo acetilo debido a la O-Acetil transferasa (*cap8J*) convirtiéndose a UDP-OAc-D-ManNAcA, para posteriormente perder sus grupos fosfato por la acción de la transferasa (*cap8H*) y terminar complementando los azúcares precursores en forma de O-Acetil-N-Acetil-D-Acido Manosaminurónico (OAc-D-ManNAcA). Una vez sintetizados y unidos los tres precursores del CP8, O-Acetil-N-Acetil-D-Acido manosaminurónico-N-Acetil-L-fucosamina-N-Acetil-D-fucosamina-Undecaprenol pirofosfato (OAc-D-ManNAcA-L-FucNAc- D-FucNAc-pp-Und), estos serán difundidos de manera transversal a través de la membrana celular por una enzima denominada flipasa (*cap8I*) quien realizará este movimiento de traslado conocido como *flip-flop* al exterior de la bacteria; y así de manera sucesiva se adicionen (n)

veces los precursores de polisacáridos requeridos para la estructuración del CP8 (Figura 2).<sup>9</sup>

La síntesis del CP5 es similar a la anterior, está también se inicia a partir del mismo azúcar en común (UDP-D-GlcNAc) y de la misma manera se divide en tres vías que originan tres azúcares precursores del CP5 que se integran para ser exportados al exterior de la membrana. En la primer vía el UDP-D-GlcNAc es convertido a UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-D-xylo-4-hexulosa por la acción de la 4,6-deshidratasa (*cap5D*), posteriormente la 4-reductasa (*cap5N*) la modifica a UDP-D-FucNAc, este último azúcar sufrirá pérdida de sus grupos fosfato por la transferasa (*cap5M*) y se le adicionará el pp-Und para generar el primer precursor del CP5 (D-FucNAc-pp-Und). En la segunda vía el azúcar inicial bajo la acción de la 4,6-deshidratasa y la 3,5-epimerasa (*cap5E*) cambia a UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-L-xylo-4-hexulosa, esta última es reducida a UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-L-talosa (UDP-L-6dTalNAc) por la reductasa (*cap5F*), posteriormente sufre un cambio en la posición del carbono 2 del epímero por la 2-epimerasa (*cap5G*) y la adición de un grupo acetilo por la O-Acetil transferasa (*cap5H*) originando uridin difosfato-O-Acetil-N-Acetil-L-fucosamina (UDP-OAc-L-FucNAc), por último la transferasa (*cap5L*) le resta sus grupos fosfato y la adiciona al primer precursor del CP5, O-Acetil-N-Acetil-L-fucosamina-N-Acetil-D-fucosamina-Undecaprenol pirofosfato (OAc-L-FucNAc-D-FucNAc-pp-Und). La tercera vía, la cual también inicia a partir del UDP-D-GlcNAc, es modificado a UDP-D-ManNAc por la 2-epimerasa (*cap5P*) para posteriormente perder hidrógenos por la acción de la deshidrogenasa (*cap5O*) y transformarse a UDP-D-ManNAcA, este último azúcar es acarreado por la transferasa (*cap5I*) a los precursores de las dos vías previas para conformar en producto final de la síntesis del CP5, N-Acetil-D-Acido manosaminurónico-O-Acetil-N-Acetil-L-fucosamina-N-Acetil-D-fucosamina-Undecaprenol pirofosfato (D-ManNAcA-OAc-L-FucNAc-D-FucNAc-pp-Und) el cual también será difundido a través de la membrana celular por la flipasa para que se le adicionen la cantidad requerida de polisacáridos para la estructura final del CP5 (Figura 3).<sup>18</sup>





**Figura 3.** Modificado de: Katherine O’Riordan, Jean C. Lee. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clinical Microbiology reviews, Jan. 2004.

## Clonalidad de MRSA

En un estudio realizado con 3000 cepas de *S. aureus* que incluyó aislamientos de Europa, América Latina, Estados Unidos, Japón, Taiwán, China, Dinamarca e Inglaterra, se demostró la existencia de cinco clonas: Ibérica, Brasileña, Húngara, Nueva York/Japón y Pediátrica.<sup>19</sup>

Posteriormente un estudio realizado durante un período de siete años, mostró la presencia de la clona Nueva York/Japón circulando en aislamientos mexicanos, así como el desplazamiento de la clona M para este mismo país.<sup>20</sup>

Hasta ahora se han detectado seis clonas de MRSA que circulan en hospitales mexicanos: clonas A, B, M (descendientes de la clona internacional EMRSA16) clona IB (descendiente de la clona Ibérica) clona C (descendiente de la clona Nueva York-Japón) y clona USA 300, las cuales han mostrado respetar sus perfiles de resistencia para cada una de ellas, por lo que se esperaría encontrar el mismo comportamiento clonal en referencia a la expresión de los genes *cap5* y *cap8*.<sup>21, 29</sup>

Las estrategias antimicrobianas contra *S. aureus* han permitido el desarrollo de una gran resistencia del microorganismo contra los antibióticos, dando pie a la generación de vacunas como medida alternativa para las opciones terapéuticas encaminadas al tratamiento de los MRSA. En el diseño de estas vacunas se han contemplado las opciones de generar inmunización activa y pasiva con el biológico para la población en riesgo (Cuadro 1).<sup>22</sup> Esperando que la vacuna centre sus principales mecanismos de acción en la prevención de la adherencia bacteriana, promoción de la muerte bacteriana por fagocitosis y neutralización de las exo-proteínas tóxicas que genera *S. aureus*.

### **Inmunización activa**

- Pacientes de hemodiálisis
- Hombres que tienen sexo con hombres
- Personal militar
- Prisioneros
- Pacientes que se someten a cirugía electiva
- Diabéticos
- Pacientes con VIH
- Adictos a drogas intravenosas
- Personal de salud
- Atletas
- Niños en edad escolar

### **Inmunización pasiva**

- Pacientes bajo cirugía de emergencia
- Pacientes con prótesis o implantes intravasculares
- Víctimas de trauma
- Pacientes inmuno comprometidos
- Neonatos con bajo peso y talla
- Pacientes de unidades de terapia intensiva

**Cuadro 1.** Tomado de: Adam C. Schaffer, Jean C. Lee. Staphylococcal vaccines and immunotherapies. Infect Dis. Clin. N Am 23, 2009.

## **Justificación**

Debido al incremento en las infecciones ocasionadas por *S. aureus*, actualmente se generan gastos elevados en la atención médica de estos padecimientos, así como elevadas tasas de morbi-mortalidad.

Una de las estrategias para la prevención de las infecciones estafilocócicas es la formulación de vacunas, donde los polisacáridos capsulares juegan un papel importante, dado que son moléculas que se consideran para ser incluidas en dichas formulaciones.

Se tiene documentado que las cepas de MRSA se agrupan en un reducido número de clonas que circulan en diferentes partes del mundo y que estas clonas portan determinantes de resistencia y virulencia específicos del patrón clonal al que pertenecen.

Por lo antes mencionado se pretende determinar cuales son los polisacáridos que portan las clonas de *S. aureus* causantes de infecciones en hospitales mexicanos; evidencia que puede ayudar a la evaluación de coberturas de vacunación cuando las vacunas estafilocócicas en desarrollo estén disponibles.

## **Pregunta de investigación**

¿Cuáles son los genotipos capsulares de las clonas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) que circulan en hospitales mexicanos?

## **Hipótesis**

Los genotipos capsulares de CP5 y CP8 se encuentran presentes de forma predominante en las clonas de *S. aureus* meticilino resistentes que circulan en hospitales mexicanos.

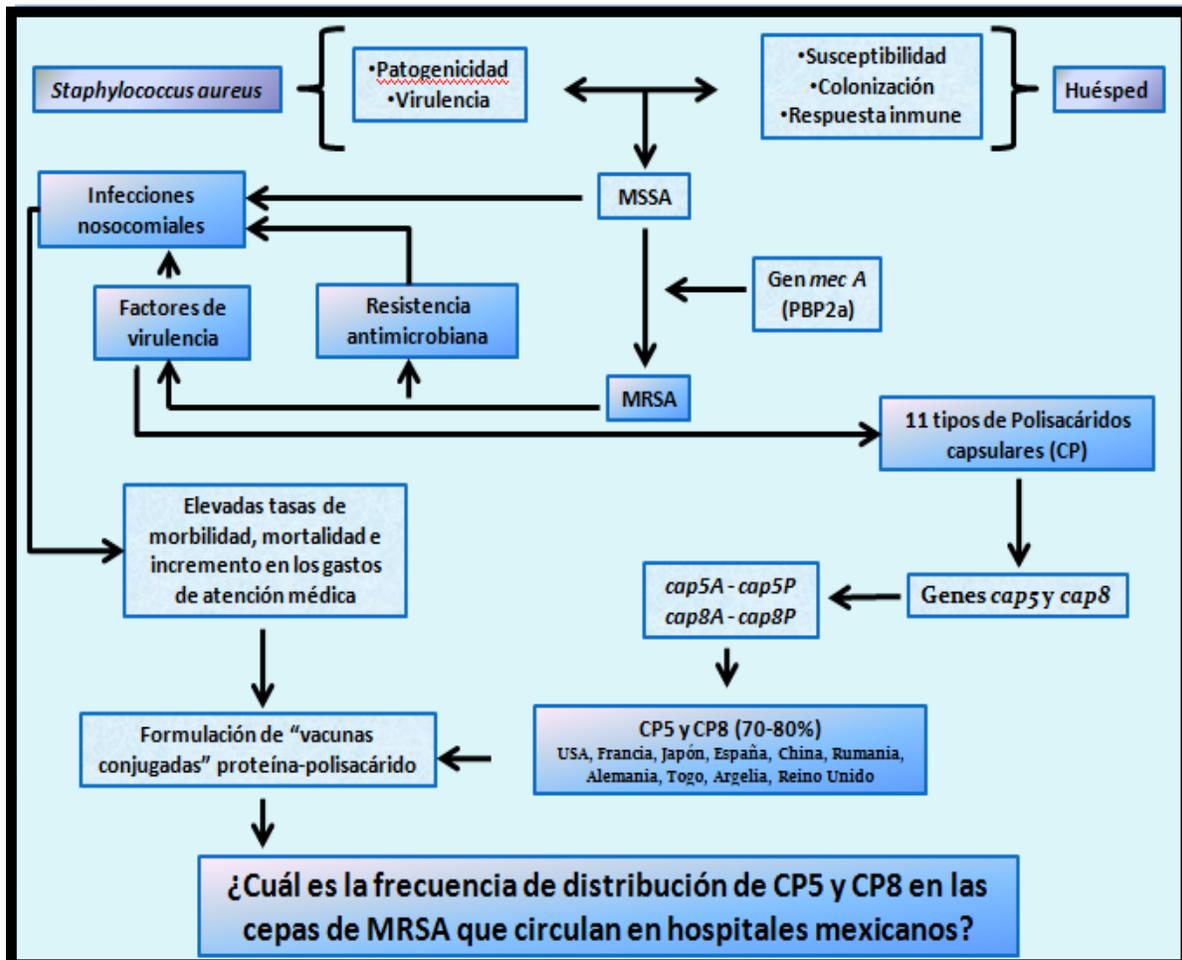
## Objetivo general

Conocer la distribución de frecuencias de los genotipos capsulares *cap5* y *cap8* en clonas de *S. aureus* meticilino resistentes presentes en aislamientos mexicanos.

## Objetivos particulares

1. Determinar el patrón clonal de las cepas de MRSA colectadas en el periodo 2007-2012.
2. Relacionar el genotipo capsular con el grupo clonal.

## Mapa conceptual



## Metodología

### Población de estudio

A partir de 817 cepas de MRSA aisladas de siete hospitales mexicanos: Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” (n=10), Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (n=7), Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” (n=22), Hospital General de San Luis Potosí (n=1), Hospital Regional del ISSSTE “Gonzalo Castañeda” (n=1), Hospital Universitario de Monterrey (n=9) y las clínicas 4 y 33 del IMSS Monterrey (n=2); del período comprendido entre 1997 y 2006, se analizaron 52 cepas que fueron representativas de las clonas (A, B, M, C y sus subtipos); descendientes de las clonas epidémicas EMRSA16 y Nueva York-Japón.

Mientras que en el período comprendido entre 2007 y 2012 se obtuvo un total de 969 cepas de MRSA de 8 hospitales mexicanos; de este total se analizaron 210 cepas seleccionadas aleatoriamente con un error de estimación de 4% y una  $p=0.88$  esperando que los resultados obtenidos dieran una aproximación más actualizada de las frecuencias de *cap5* y *cap8* que circulan en las cepas de MRSA de nuestro país (Tabla 1). Las cepas que se analizaron fueron de los siguientes hospitales: Hospital San José TEC de Monterrey (n=17), Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (n=15), Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (n=20), Instituto Nacional de Cancerología (n=38), Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” (n=56), Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” (n=11), Hospital Regional de Veracruz (n=23) y las clínicas 2, 4, 33 y 34 del IMSS Monterrey (n=30). El estudio fue de tipo transversal, analítico y experimental.

Los sitios de aislamiento fueron clasificados de la siguiente manera: absceso (A), aspirado bronquial (AB), esputo (E), hemocultivo (H), herida quirúrgica (HxQx), líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural (LP), punta de catéter (C), secreción de piel o tejidos blandos (SP), otros sitios de aislamientos (O), desconocidos (X).

AÑO	INCAN	HCG	CMN	SJT	CARD	UACH	HRV	MTY-IMSS	TOTAL	MEDIA/AÑO
2007	28 (6)	57 (13)	13 (3)	0	20 (4)	0			118	59
2008	34 (7)	92 (20)	8 (2)	19 (4)	9 (2)	0		127 (28)	289	145
2009	54 (12)	10 (2)	0	3 (1)	8 (1)	32 (7)	28 (6)	10 (2)	145	73
2010	36 (8)	29 (6)	15 (3)	17 (4)	2 (1)	0	79 (17)		178	89
2011	19 (4)	19 (4)	18 (4)	26 (5)	1 (1)	38 (8)			121	61
2012	6 (1)	49 (11)	37 (8)	14 (3)	12 (2)	0			118	59
TOTAL	177 (38)	256 (56)	91 (20)	79 (17)	52 (11)	70 (15)	107 (23)	137 (30)	N=969 (N=210) *	485
MEDIA/HOSP	107	128	46	40	26	35	53	69	485	

\* Número de muestras seleccionadas para el estudio.

**Tabla 1.** Número aislamientos de MRSA del período 2007-2012. (**INCAN:** Instituto Nacional de Cancerología; **HCG:** Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”; **CMN:** Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI; **SJT:** Hospital San José Tec de Monterrey; **CARD:** Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”; **UACH:** Universidad Autónoma de Chihuahua, Hospital General “Salvador Zubirán”, Hospital Central del Estado de Chihuahua, Hospital Infantil de Chihuahua y Hospital del Parque “Christus Muguerza”; **HRV:** Hospital Regional de Veracruz; **MTY-IMSS:** Clínica 2-IMSS-Monterrey, Clínica 4- IMSS-Monterrey, Clínica 33-IMSS-Monterrey y Clínica 34-IMSS-Monterrey).

### Crecimiento bacteriano y extracción de DNA

Las cepas bacterianas se sometieron a crecimiento en agar de soya tripticasa (TSA) por 18 horas a 37°C; posteriormente se sembraron de 2 a 3 colonias en caldo de soya tripticasa (TSB) por 17 horas a 37°C en agitación a 180rpm; después se tomó 1ml de cultivo bacteriano y se centrifugó a 14,000rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se desechó y se conservó la pastilla a la cual se le agregaron 600µl de solución de lisis. Se sometió a lisis por calor a 80°C durante 5 minutos y se agregaron 2µl de RNAsa, 2µl de lisosima y 2µl de lisostafina, se mezclaron e incubaron por una hora a 37°C. Se agregaron 200µl de solución de precipitación de proteínas y se agitó con vortex 20 segundos, las muestras se colocaron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 14,000rpm 10 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf limpio y se adicionaron 600µl de isopropanol. Las muestras se centrifugaron a 14,000rpm por 10 minutos y se

decantó el sobrenadante para quedar con la pastilla de DNA, se agregó 600µl de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000rpm por 10 minutos y la pastilla se dejó secar durante 15 minutos. Por último se procedió a hidratar el DNA con 100µl de solución de hidratación y la muestra se conservó a 4°C toda la noche. La cuantificación del DNA se llevó a cabo en un NanoDrop y la muestra se conservó a -20°C, hasta su uso.

### **Condiciones de amplificación por PCR**

Para la amplificación por PCR se utilizaron los primers *cap5-1* (5'-GGTTTGCTGAAAAACCAGTC-3') y *cap5-2* (5'-CCTCATATGCTCCTACATTT-3')<sup>23</sup> y los primers *cap8-1* (5'-GCGCTACAAACATTAAGCAT-3') y *cap8-2* (5'-TTCTTAGCCTGCTGGCATC-3')<sup>23</sup>. Las cepas controles utilizadas en este estudio fueron ATCC49521 para *cap5* y ATCC49525 para *cap8*.

La amplificación se realizó en un termociclador marca Eppendorf bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial por 4 minutos a 94°C, seguida por 25 ciclos de 20 segundos de desnaturalización a 94°C, 20 segundos de alineamiento a 50°C, 50 segundos de extensión a 72°C, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis y teñidos con bromuro de etidio en geles de agarosa al 1%. Los tamaños de los fragmentos fueron de 185pb para *cap5* y 170pb para *cap8*.

### **Preparación de discos de DNA para PFGE**

Las cepas bacterianas se sometieron a crecimiento en un medio de cultivo de TSA por 18 horas a 37°C, posteriormente se sembraron de 2 a 3 colonias en TSB por 17 horas a 37°C a 180rpm; después se tomó 1ml de cultivo bacteriano y se centrifugó a 14,000rpm durante 10 minutos, la pastilla se resuspendió en un 1ml de PIV (Tris pH 8.0 1M, NaCl 5M) y se centrifugó a 14,000rpm durante 10 minutos, se retiró la solución de PIV y se adicionó 410µl de PIV; a partir de ahí se hizo una mezcla de 150µl de suspensión bacteriana más 150µl de agarosa "Sea Plaque

GTG” al 1.5%, a partir de 20µl de la mezcla se realizaron los discos de DNA; los discos se colocaron en un tubo Falcon y se agregó 1ml de solución EC-Lisis (Tris pH 8.0 1M, NaCl 1M, EDTA ph 8.0 0.5M, desoxicolato de sodio 0.2%, Na lauril sarcosil 0.5%, lisosima, lisostafina y RNA´sa) por cada cepa, se incubaron a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se retiró la solución EC-Lisis y le agregó un 1ml de solución ES-P (EDTA pH 9.0 0.5M, Na lauril sarcosil 1% más proteinasa K) y se incubaron en baño María a 50°C por 17 horas. Trascurrido dicho tiempo los discos se lavaron 5 veces con TE 1X (Tris pH 7.5 10mM, EDTA 1mM) durante 1 hora.

### **Restricción de discos de DNA para PFGE**

Se colocó un disco de DNA en un tubo Eppendorf y se le adicionó 300µl de solución pre-Sma (Tris pH 8.0 6mM, KCl 20mM, MgCl<sub>2</sub> 6mM), se incubaron a 25°C por 30 minutos. Trascurrido el tiempo se retiró la solución de pre-Sma y se agregó 50µl de pre-Sma con 15U de enzima *Sma I* por disco y se incubó a 25°C durante 17 horas. Al término del tiempo de restricción se agregó 10µl de amortiguador de carga y se conservaron a 4°C hasta su uso.

### **Condiciones de corrida para PFGE**

Los discos de DNA restringidos se colocaron en un gel de agarosa “Sea Kem LE” al 1% (1.5grs de agarosa, 150ml de buffer TBE 0.5X). La electroforesis se llevó a cabo en un equipo de campos pulsados CHEF-DRII con buffer TBE 0.5X bajo las siguientes condiciones: tiempo inicial de pulso 1 segundo, tiempo final de pulso 30 segundos, 6 volts, ángulo de 120°, tiempo de corrida 23 horas. Al término de la corrida el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un foto documentador de UV. La determinación del patrón clonal se realizó en base a los criterios de Tenover 1995.<sup>24</sup>

## **Consideraciones éticas**

Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado. (Anexo 1, carta de aprobación del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública)

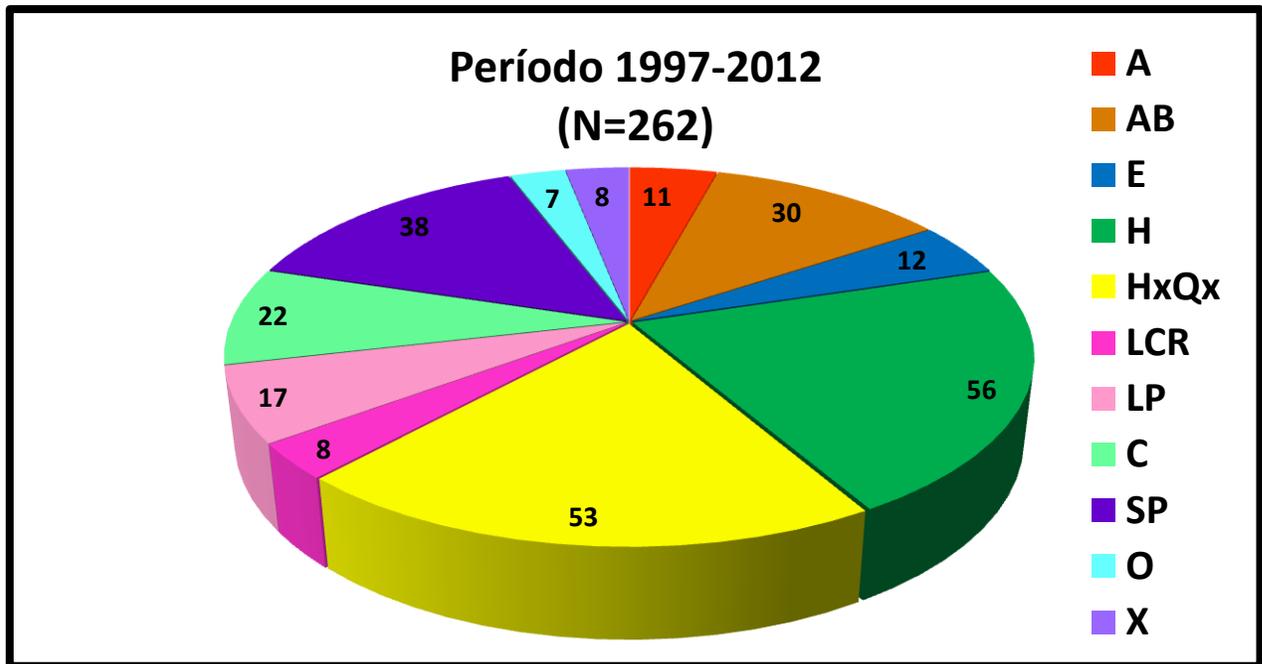
## **Consideraciones de bioseguridad**

Los desechos biológicos infecciosos: cultivos bacterianos en medios sólidos y líquidos y los desechos CRETI (corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos e inflamables) generados en el transcurso de la investigación, fueron registrados y dispuestos en el laboratorio 1 planta alta de acuerdo a los lineamientos de bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública. (Anexo 2, carta de aprobación de la Comisión de Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública).

Anexo 3, carta de aprobación de la Comisión de Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública.

## Resultados

En este estudio se observaron cuatro principales sitios de aislamientos de MRSA: hemocultivo (H) 21.3%, herida quirúrgica (HxQx) 20.2%, secreción de piel o tejidos blandos (SP) 14.5% y aspirado bronquial (AB) 11.4% (Figura 4).



**Figura 4.** Distribución de los sitios de aislamiento de las cepas de MRSA analizadas en ambos períodos.

En el análisis de frecuencias de polisacáridos capsulares se observó que de las 262 cepas de *S. aureus* estudiadas, 245 (93.5%) portaron el gen de *cap5* y solo 17 (6.5%) el gen de *cap8*.

En los dos períodos estudiados se encontró que la expresión de los genotipos capsulares estuvo directamente relacionada con el patrón clonal que las cepas de MRSA presentaron (Figura 5 y 6).

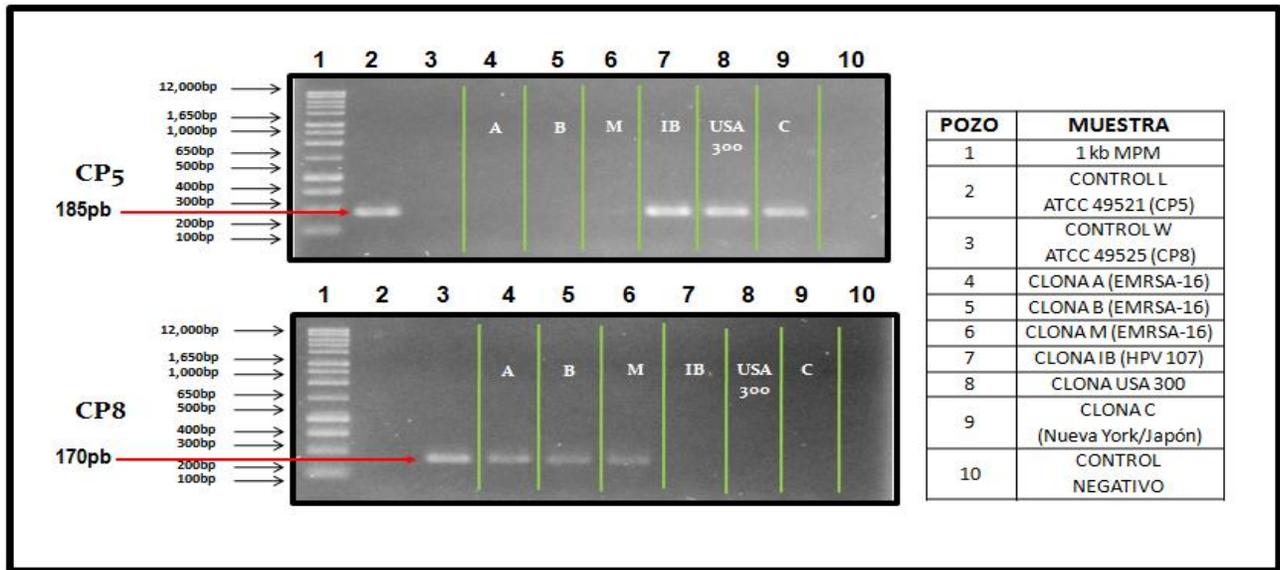


Figura 5. Expresión de los genotipos capsulares *cap5* y *cap8* por patrón clonal.

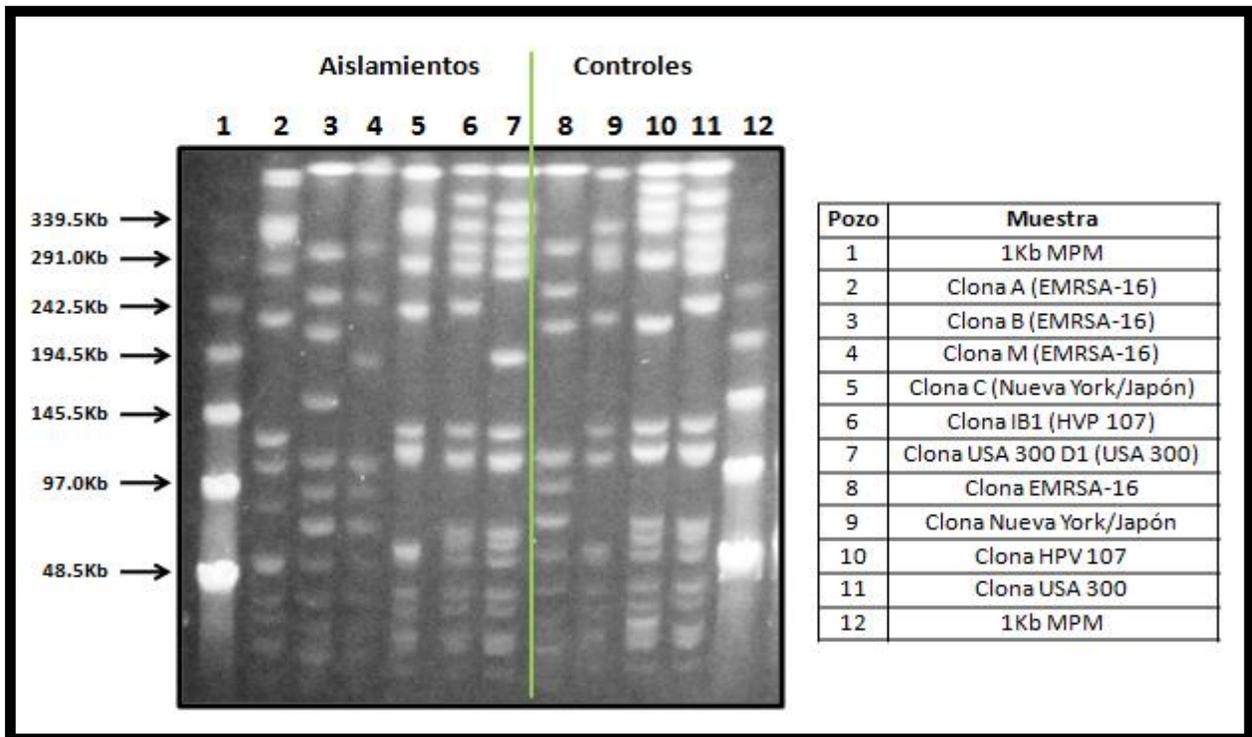
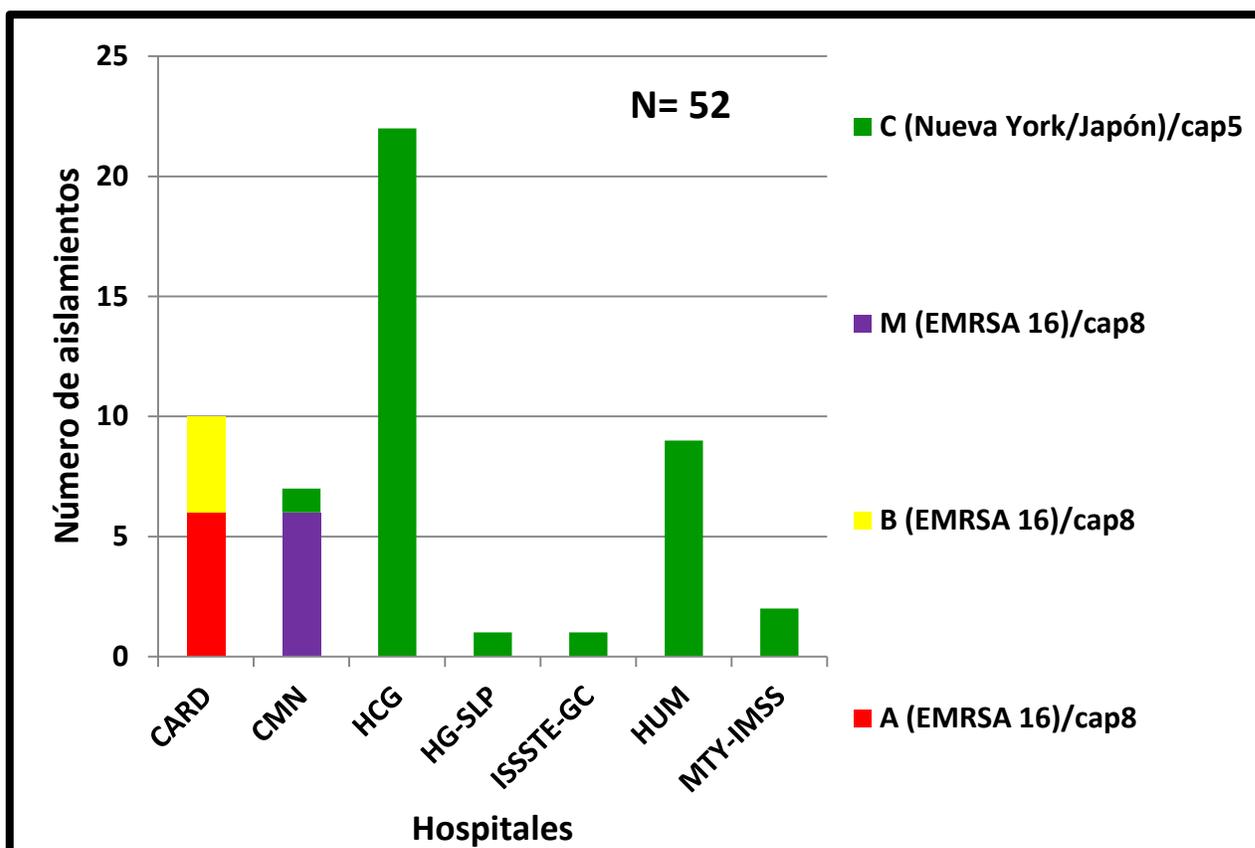


Figura 6. Determinación de patrón clonal de las cepas de MRSA colectadas en el período 2007-2012.

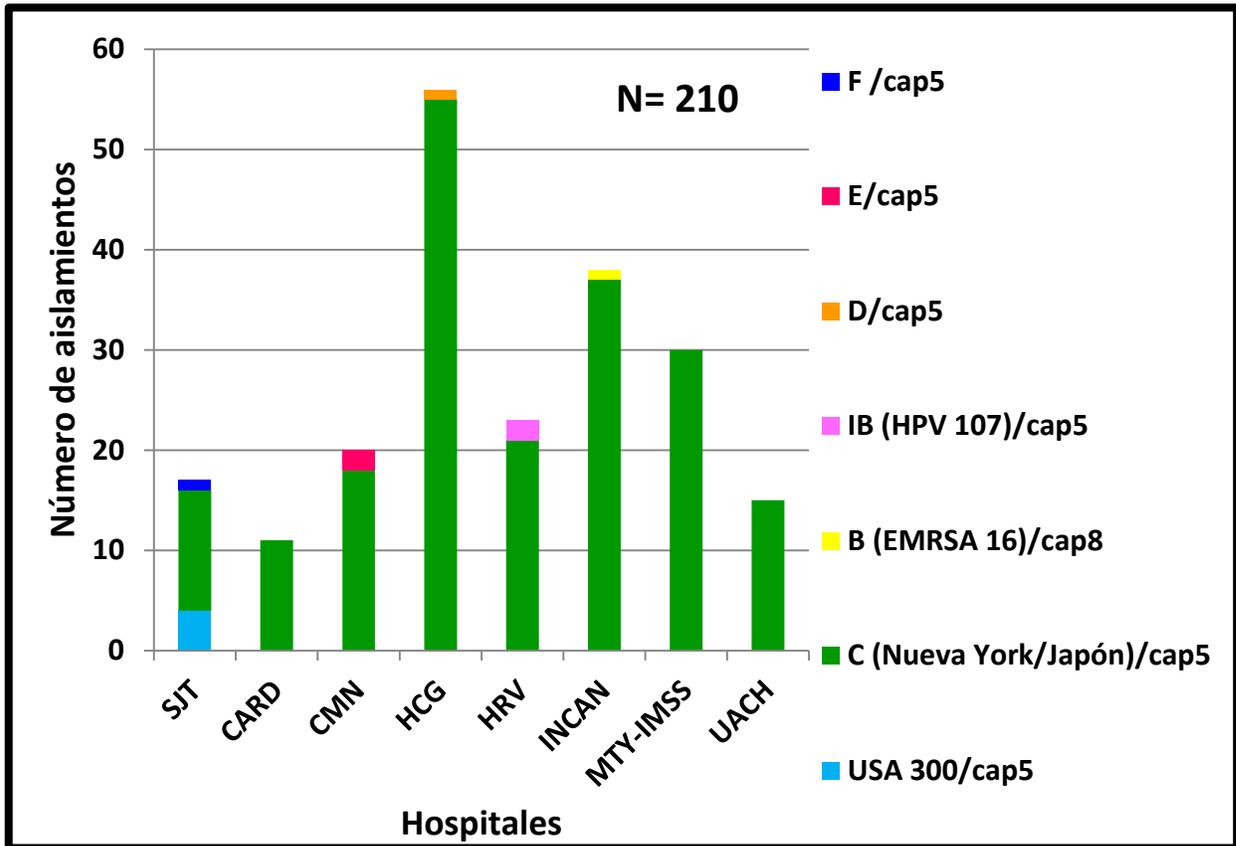
En las cepas de MRSA del primer período (1997-2006) se encontró una alta distribución del gen de *cap5* n= 36 cepas (69.2%) y por el contrario solo 16 cepas (30.8%) portaron el gen de *cap8*. Las cepas de MRSA descendientes de la clona epidémica EMRSA16 portaron el gen de *cap8*; mientras que las cepas de MRSA descendientes de la clona Nueva York/Japón portaron el gen específico para *cap5* (Figura 7).



**Figura 7.** Relación entre genotipos capsulares *cap5* y *cap8* y clonas de MRSA en hospitales mexicanos en el período 1997-2006.

Los resultados de las 210 cepas de MRSA analizadas en el período comprendido entre en 2007 y 2012, mostraron que 209 cepas portaron el gen de *cap5* (99.5%) y solo una cepa (0.5%) portó el gen de *cap8*. Al igual que en el primer período la expresión del genotipo capsular se encontró directamente relacionada con el

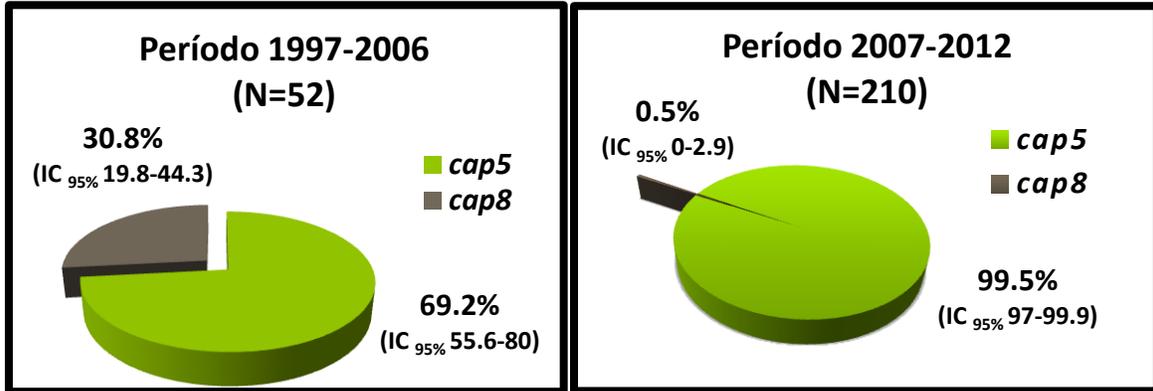
patrón clonal que presentaron las cepas de MRSA presentes en esta etapa (Figura 8).



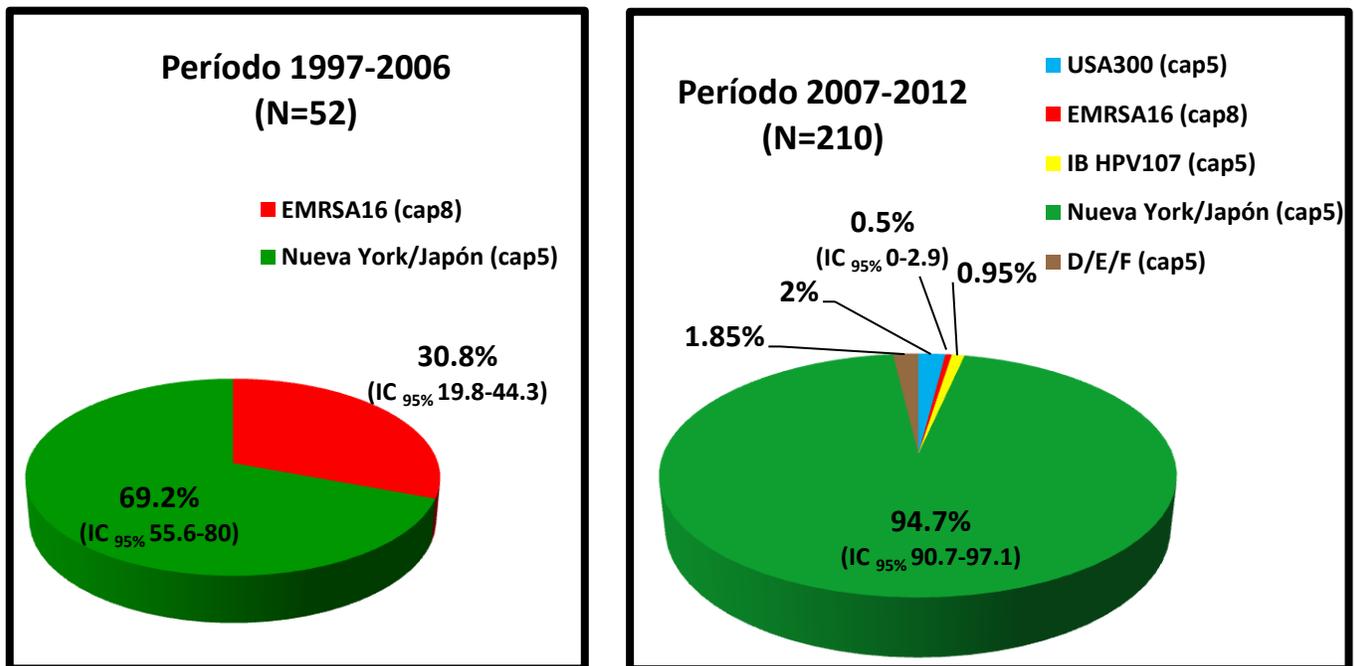
**Figura 8.** Relación entre genotipos capsulares *cap5* y *cap8* y clonas de MRSA en hospitales mexicanos en el período 2007-2012.

La distribución de los genotipos capsulares *cap5* y *cap8* varió entre los dos períodos estudiados; dicha distribución se encontró estrechamente relacionada con el desplazamiento clonal que se observó entre ambos períodos analizados, tal es el caso del hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”, en donde en el primer período de estudio las clonas de MRSA predominantes (M, A y B) eran descendientes de la clona epidémica EMRSA16 portando el gen de *cap8*, para posteriormente ser desplazada en su totalidad por la clona Nueva York-Japón; que porta el gen para *cap5*; además se observó el surgimiento de las clonas Ibérica y

USA300, así como otros patrones minoritarios (D, E y F), no relacionados entre ellos y entre los otros grupos clonales encontrados (Figura 9 y 10).



**Figura 9.** Comparación de la distribución de los genotipos capsulares *cap5* y *cap8* en aislamientos de MRSA estudiados durante los dos períodos de estudio.  $\chi^2= 63.03$ ,  $P < 0.0001$ .



**Figura 10.** Comparación de la distribución clonal de los aislamientos de MRSA durante los dos períodos de estudio.  $\chi^2= 60.1$ ,  $P < 0.0001$ .

## Discusión

Este estudio fue realizado para conocer la frecuencia de los genotipos capsulares de CP5 y CP8 en cepas de MRSA aisladas de varios hospitales mexicanos. En diferentes estudios realizados alrededor del mundo (Estados Unidos, Francia, Japón, España, China, Rumania, Alemania, Togo, Argelia, Reino Unido) se ha observado que los polisacáridos CP5 y CP8 se encuentran presentes en los aislamientos de *S. aureus* de importancia clínica con una frecuencia que oscila entre 70 y 80%.

Essawi *et al.* Reportó que en Jerusalén durante el período 1993-1994 la frecuencia de polisacáridos CP5 y CP8 fue de 93.7% para ambos polisacáridos y de 6.3% para polisacáridos no tipificables; en lo que respecta a CP8 este mostró una prevalencia de 73%, y para CP5 de 20.7%.<sup>25</sup>

En un estudio realizado por Verdier *et al.* En el que incluyeron 69 aislamientos de MRSA y 126 de *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA) provenientes de 9 países (Francia, Japón, Estados Unidos, Algeria, España, China, Rumania, Alemania y Togo) entre el período 2001-2004, reportó que 42% de los aislamientos estudiados expresaron el polisacárido capsular CP5, y 45% el polisacárido capsular CP8, el 13% restante no fueron tipificables.<sup>26</sup> Veinte años antes, Fournier *et al.* Reportó una distribución similar entre 406 aislamientos clínicos de seis hospitales franceses, 43% fueron positivos para CP5 y 40% lo fueron para CP8, 17% se reportaron como no tipificables.<sup>27</sup>

Pardo *et al.* Reportó los resultados de un estudio realizado en Uruguay en el período de 2004-2005, el cual incluyó 90 cepas de *S. aureus* meticilino resistente adquiridos en la comunidad (CA-MRSA), donde 85 cepas expresaron por coagulación el polisacárido capsular CP8 y estas cepas estuvieron relacionadas con la clona EMRSA16, cuatro cepas fueron no tipificadas por este método pero con genotipo positivo para *cap8* por PCR y solo una cepa fue positiva para CP5.<sup>28</sup>

En nuestro estudio se encontró que las cepas de MRSA aisladas en diversos hospitales de nuestro país portaron genes para *cap5* o *cap8* con una frecuencia de 93.5% y 6.5% respectivamente; en este estudio no se detectaron aislamientos no tipificables; como los reportados en otros trabajos.

Sutter *et al.* Realizó un estudio en Estados Unidos, en el cual incluyeron aislamientos clínicos de MRSA y MSSA del período 2004-2005; de 91 aislamientos analizados 56% (n=51) portaron el gen *cap5* y 44% (n=40) el gen *cap8*, en estos mismos aislamientos la expresión capsular de CP5 o CP8 por coaglutinación fue detectada en solo 57 aislamientos (62%) y los 34 aislamientos restantes (38%) reaccionaron con el anticuerpo del polisacárido 336PS (no tipificables); sugiriendo que la falta de expresión de la cápsula es común entre los aislamientos clínicos de las cepas de *S. aureus*.<sup>29</sup>

Lattar *et al.* Observó que al estudiar aislamientos provenientes de pacientes con osteomielitis crónica, la pérdida de la expresión de la cápsula puede desempeñar un papel en la persistencia de *S. aureus* en el huésped infectado crónicamente; encontró que las cepas de *S. aureus* no tipificadas como CP5 o CP8 se aislaron con mayor frecuencia a partir de pacientes con osteomielitis crónica que de aquellos con osteomielitis aguda o de aislamientos obtenidos de sangre.<sup>30</sup>

Sordelli *et al.* Demostró que las cepas de *S. aureus* no tipificables son prevalentes hasta en un 86% en los bovinos con mastitis subclínica.<sup>31</sup>

Cocchiaro *et al.* Sugiere que existen solo cuatro serotipos capsulares (CP1, CP2, CP5 y CP8),<sup>32</sup> aunque otros autores como O'Riordan *et al.* Mencionan que existen 11 serotipos.<sup>18</sup> Estos datos son importantes para el desarrollo de vacunas, porque a pesar de que 80 a 90% de los aislamientos clínicos de MRSA en otros países presentan los genotipos capsulares *cap5* y *cap8*. Si solo se consideran estos polisacáridos para la formulación de la vacuna se dejarían descubiertas 10 a 20% de las cepas que poseen polisacáridos no tipificables. Verdier *et al.* Coincide en que si se considera la adición del anticuerpo 336PS en esta vacuna esto

aumentaría la cobertura al 100% de todas las infecciones producidas por *S. aureus*.<sup>26</sup> A pesar de que en nuestro estudio no se detectaron cepas de *S. aureus* no tipificables, esto no significa que no puedan estar circulando en nuestra población, sino más bien sería necesario ampliar el estudio al análisis de aislamientos de *S. aureus* sensible a meticilina y de cepas aisladas de portadores. Este estudio pone de manifiesto la alta distribución de los genes *cap5* sobre *cap8* y su asociación directa con el origen clonal de los MRSA que circulan en nuestro país; así como el desplazamiento y surgimiento de clonas de *S. aureus* metilino resistentes a nivel hospitalario; debido muy probablemente a la presión selectiva a la que son sometidos estos grupos bacterianos, en donde tienden a prevalecer quienes tienen más mecanismos de resistencia, patogenicidad y virulencia.

## Conclusiones

Los polisacáridos capsulares expresados por *S. aureus* son ciertamente importantes en la patogénesis de las infecciones estafilocócicas; el hecho de que estos polisacáridos sean considerados como blancos antigénicos en la formulación de vacunas incentiva la necesidad de conocer acerca de su comportamiento epidemiológico.

En nuestro estudio se encontró de manera predominante la presencia del gen *cap5* y esto estuvo directamente relacionado con la predominancia de algunos grupos clonales.

En el presente estudio se deja de manifiesto el desplazamiento clonal que han tenido en el curso del tiempo las cepas portadoras del gen de *cap5* sobre las portadoras del gen *cap8*.

Nuestros resultados indican un decremento de *cap8* a lo largo del tiempo.

En el segundo periodo de estudio se observó el surgimiento de nuevos grupos clonales.

La ausencia de cepas no tipificables pudo deberse a que en este estudio solo se analizaron aislamientos clínicos resistentes y no se incluyeron cepas sensibles hospitalarias, ni aislamientos de *S. aureus* de portadores, que son donde se han reportado las cepas no tipificables.

## **Limitaciones**

- No se estudiaron cepas hospitalarias sensibles.
- No se estudiaron cepas de portadores.
- Los aislamientos estudiados no son representativos del país

## **Perspectivas**

- Analizar aislamientos clínicos de *S. aureus* sensibles a meticilina.
- Analizar aislamientos de portadores sanos.
- Detectar por coagulación la presencia de polisacáridos de *S. aureus*

## **Agradecimientos**

- Dr. Jacobo Ayala (Hospital San José Tec de Monterrey).
- Dr. Gilberto Erosa (Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua).
- Dra. Guadalupe Miranda/Dr. Fortino Solórzano (Centro Médico Nacional Siglo XXI).
- Dra. Patricia Cornejo (Instituto Nacional de Cancerología).
- Dra. Rayo Morfin (Hospital Civil de Guadalajara).
- QBP. Rosario Vázquez (Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”).
- Dra. Rosa María Hinojosa (Hospital Universitario de Monterrey).
- M. en C. Poul Mora/M. en C. Miguel Ángel Ortiz (Hospital Regional de Veracruz).
- Dra. Licet Villareal Treviño (Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Personal de laboratorio (Clínicas del IMSS Monterrey).
- Dra. Betty Soledad Manríquez (Instituto Nacional de Salud Pública)

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kanafani Z, Fowler V, *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006, 3:182-93.
2. Ducel G, Fabry J, Bernard C, *et al.* Prevención de las infecciones nosocomiales: Guía Práctica. Organización Mundial de la Salud. Ed. Minimum Graphics. Malta. 2003. Pp.4-14.
3. INCMN “Salvador Zubirán”. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. México. 2011. Pp. 15,49-53.
4. Kloss W, Crossley K, Archer G, *et al.* Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In the *Staphylococci* in human disease. Nueva York: Churchill Livingstone, 1997:113-215.
5. Klein E, Smith D, Laxminarayan R, *et al.* Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerg Infect Dis.* 2007, 13:1840-1846.
6. Secretaría de Salud. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria (RHoVE). México. 2012. Pp.11-31.
7. Cardo D, Horan T, Andrus M, *et al.* National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004. *American Journal Infection Control* 2004. 32:470-85.
8. Guzmán B, Mejía C, Isturiz R, *et al.* Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2009, 304–308.
9. Honeyman A, Friedman H, Bendinelli M. *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Kluwer Academic Publishers. New York. 2002. ISBN 0-306-46848-4.
10. Milstone A, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and risk of subsequent infection in critically ill children: importance of preventing nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Clin Infect Dis.* 2011, 53: 853-859.
11. Szakacs A, Toye B, Turnbull J, *et al.* Prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* in a canadian inner-city shelter. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2007, 18:249–252.
12. Morfin O. Comunicación personal. Hospital Civil de Guadalajara. Guadalajara, México. 2010.

13. Howe R, Brown N, Spencer R, *et al.* The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. *J Clin Pathol* 1996, 49:444-9.
14. Laurence L, John S, Keith L. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. New York. 2006. ISBN 0-07-026266. Pp.1098-1113.
15. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, *et al.* The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2001, 9:486-93.
16. Hanssen A, Ericson J, *et al.* SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006, 46:8-20.
17. Jaime B, Aída H, Marcia G, *et al.* *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed.* 2006, 17:287-305.
18. Katherine O, Jean C, *et al.* *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 2004, 17:218-234.
19. Roberst B, Chung M, *et al.* Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey and Pennsylvania. *Microbiol Drug Resist.* 2000, 6: 245-251.
20. Velazquez M, de Sousa A, Echaniz A, *et al.* Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): Clonal evolution and impact of infection control. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42: 3877-3880.
21. Gel Electrophoresis-Advanced Techniques, Edited by Sameh Magdeldin. Pulsed Field Gel Electrophoresis in Molecular Typing and Epidemiological Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Published by InTech, 2012, pp. 179-192, ISBN 978-953-51-0457-5, Croatia.
22. Adam C, Jean C, *et al.* Vaccination and passive immunization against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2008, 32:71-78.
23. Sau S, Bhasin N, Wann E, *et al.* The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. *Microbiology*, 1997. 143: 2395-2405.
24. Tenover F, Arbeit R, Goering R, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-2239.

25. Tamer E, Tarek N, *et al.* Molecular, antibiogram and serological typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Al-Makased hospital in East Jerusalem. *Tropical Medicine and International Health*. 1998, 3:576-583.
26. Verdier I, Durand G, *et al.* Identification of the Capsular Polysaccharides in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates by PCR and Agglutination Tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, 45: 725-729.
27. Fournier J, Bouvet A, *et al.* Predominance of capsular polysaccharide type 5 among oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25:1932–1933.
28. Pardo L, Machado V, *et al.* Characteristics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Strains Isolated from Skin and Soft-Tissue Infections in Uruguay. *International Journal of Microbiology*. 2009, ID 472126:5.
29. Sutter D, Summers A, *et al.* Capsular serotype of *Staphylococcus aureus* in the era of community-acquired MRSA. *Federation of European Microbiological Societies*. 2011, 63:16-24.
30. Lattar S, Pardo L, Tuchscher N, *et al.* Capsule Expression and Genotypic Differences among *Staphylococcus aureus* Isolates from Patients with Chronic or Acute Osteomyelitis. *Infection and Immunity*. 2009, 77:1968-1975.
31. Sordelli D, Buzzola F, Gómez M, *et al.* Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38:846–850.
32. Cocchiari J, Gómez M, Risley A, *et al.* Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 2006, 59:948–960.

## Anexos:

### Anexo 1.

 Instituto Nacional de Salud Pública  
Generación de conocimiento para el desarrollo de políticas de salud

 **CEI** Comité de Ética en Investigación  
Instituto Nacional de Salud Pública

Cuernavaca, Morelos, a 14 de enero de 2014  
CI Tesis: 647

**Brian Rodríguez Arvizu**  
Maestría en Ciencias –  
Área de concentración en Enfermedades Infecciosas  
Presente

En relación a su protocolo de tesis titulado *“Identificación de genotipos capsulares de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina (MRSA) en aislamientos mexicanos”*, me permito informarle que los miembros de este Comité han acordado otorgarle el dictamen de:

**Aprobado**

Le informamos que esta aprobación tiene vigencia hasta el 13 de enero del 2015.

**Renovación anual:** Si su estudio se extiende por un periodo mayor, favor de presentar el formato de *Renovación anual* con 45 días de anticipación a su fecha de vencimiento. Favor de solicitar vía electrónica el formato correspondiente a este Comité. Nota: Es responsabilidad de usted como Investigador Responsable de este proyecto solicitar la renovación anual de su estudio con suficiente anticipación.

**Consentimiento:** Para obtener el consentimiento de los sujetos humanos de su estudio únicamente se deberán utilizar los materiales que han sido aprobados y sellados por este Comité.

**Addenda/Modificaciones:** Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a este Comité previo a su implementación.

Le solicito atentamente que en caso de ocurrir algún cambio o actualización de datos que afecten el planteamiento actual de su protocolo de tesis, lo comunique oportunamente para someterlo a consideración de este Comité.

Atentamente



**Mtra. Angélica Ángeles Llerenas**  
Presidente

ccp. Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán - Coordinador Maestría en Ciencias – Enfermedades Infecciosas  
Mtro. Miguel Ángel Reyes – Depto. Asuntos Escolares

Avenida Universidad 655  
Cerrada Los Pinos y Caminera  
Colonia Santa María Ahuacatlán  
62300 Cuernavaca, Morelos, México  
com: (777) 329 3000

**www.insp.mx**

Anexo 2.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA  
COMITÉ DE BIOSEGURIDAD



CB14-065.

Cuernavaca, Mor., a 19 de febrero del 2014.

CB: 608

Brian Rodríguez Arvizu  
Tesisista de Maestría en Enfermedades Infecciosas (MC)  
ESPM-INSP  
Presente

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el protocolo del proyecto de investigación titulado: "Identificación de genotipos capsulares de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) en aislamientos mexicanos." y su respuesta en relación a la procedencia de cepas de MRSA, el dictamen del Comité de Bioseguridad es: **APROBADO**; debido a que dicho proyecto establece todas las medidas de uso y manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) y CRET; por lo que desde el punto de vista de Bioseguridad no existe ninguna objeción para continuar su proceso.

Le recordamos que cuando algún proyecto de investigación haga uso de agentes infecciosos o maneje muestras clínicas de origen humano y/o animal y no sean procesadas en este instituto, deberá enviar una carta de la institución o instituciones en la cual se responsabilizan del manejo y disposición final de los RPBI y tóxicos generados durante el transcurso de la investigación.

Atentamente,



Dr. Salvador F. Villalpando Hernández  
Presidente del Comité  
de Bioseguridad-INSP

Col. Santa María Ahuacatlilán  
62508 Cuernavaca, Morelos, México  
e-mail: svillaip@insp.mx

Tel-Fax: 01 (777) 3293000 ext 7204  
Secretaría Técnica: ext 11525  
e-mail: alejandra.contreras@insp.mx

Anexo 3.



Instituto Nacional  
de Salud Pública

Generación de conocimiento  
para el desarrollo de políticas de salud

Comisión de Investigación

No. de Proyecto 645

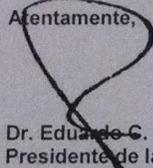
Cuernavaca, Mor., a 27 de Febrero del 2014.

**C. Brian Rodríguez Arvizu**  
**Maestría en Ciencias**  
**Área de Concentración en**  
**Enfermedades Infecciosas**  
**Presente**

Por medio del presente informo a usted, que la Comisión de Investigación evaluó su proyecto de tesis titulado: "**Identificación de genotipos capsulares de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina (MRSA) en aislamientos mexicanos**"; el dictamen de esta comisión es: **aprobado**.

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

  
**Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce**  
**Presidente de la Comisión**  
**de Investigación-INSP**

c.c.p. Mtra. Lorena Castillo Castillo.- Jefe del Departamento de Asuntos Escolares INSP.- Presente

ELP/IMMB/rlj

Avenida Universidad 655  
Cerrada Los Pinos y Caminera  
Colonia Santa María Ahuacatlán  
62100 Cuernavaca, Morelos, México  
correo: (777) 325 3000

[www.insp.mx](http://www.insp.mx)