

Caracterización molecular de aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) utilizando *mecA*-PCR y PCR-RFLP



Molecular characterization of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) using *mecA*-PCR and RFLP-PCR

Calderón González, Marilena; Ramos, Carlos; Ortiz de Moreno, Nora

Marilena Calderón González

maricalderon@css.gob.pa

Caja de Seguro Social, Panamá

Carlos Ramos

carlos.ramosd@up.ac.pa

Universidad de Panamá, Panamá

Nora Ortiz de Moreno

nortizmor@gmail.com

Universidad de Panamá, Panamá

Visión Antataura

Universidad de Panamá, Panamá

ISSN: 2309-6373

ISSN-e: 2520-9892

Periodicidad: Semestral

vol. 6, núm. 2, 2022

Luis.rodriguez@up.ac.pa

Recepción: 19 Septiembre 2022

Aprobación: 15 Noviembre 2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/225/2254099003/>

Resumen: Se estudiaron 88 aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) recuperados por la red de vigilancia bacteriológica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud del Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (ICGES-LCRSP) obtenidos en la República de Panamá con el objetivo de caracterizar molecularmente los aislados que circulan en nuestro país. Se amplificó el gen *mecA* y se demostró su presencia en el 100% de los aislados. La caracterización de los aislados se realizó mediante RFLP-PCR de los genes *coa*, *spa*, *HVR* y digestión con *HaeII*. Los aislados se agruparon en 5 categorías con base en los genes para los cuales se obtuvo amplificación. La categoría 1 con amplificación en los tres genes (24 aislamientos) generó 19 patrones de bandas diferentes. La categoría 2 con amplificación en los genes (*coa* . *spa*) agrupó 25 aislamientos con 17 patrones diferentes. La categoría 3 con amplificación en (*coa* y *HVR*) agrupó 10 aislamientos con 6 patrones. La categoría 4 con amplificación solo para *coa* con 11 aislamientos y 7 patrones. La categoría 5, sólo un aislamiento con amplificación para *HVR* generó solo un tipo de patrón. Los patrones de banda obtenidos son reproducibles y comparables con estudios previos. Nuestros resultados demuestran que RFLP-PCR es una metodología de escrutinio útil, fácil, rápida y discriminante para realizar vigilancia epidemiológica de infecciones causadas por el SARM.

Palabras clave: SARM, RFLP, HVR, *coa*, *spa*, *mecA*.

1. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos de importancia a nivel mundial debido a que está asociado con infecciones adquiridas tanto en el área hospitalaria como en la comunidad (Palavencino, 2004).

En los últimos 60 años, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) ha evolucionado en forma constante coincidiendo con la introducción de nuevos y distintos antibióticos (Álvarez et al., 2014). Esto ha generado la reaparición de cepas multidrogaresistentes, las cuales están causando serios problemas de salud pública incluyendo infecciones fatales.

La utilización de técnicas moleculares y la disponibilidad de secuencias genómicas completas ha hecho posible el desarrollo de métodos diagnósticos rápidos y específicos para la detección, vigilancia y evolución de aislados de SARM.

El objetivo de este trabajo es confirmar mediante métodos moleculares la identidad de aislados de SARM suministrados por el (ICGES-LCRS) y tipificar los mismos mediante PCR-RFLP (reacción en cadena de polimerasa mediante longitud de fragmentos de patrones de restricción) generados a partir de los genes de coagulasa (*coa*), proteína A (*spa*) y la región hipervariable (HVR) del gen *mecA*.

Se logró separar los aislamientos en 5 categorías con base a la amplificación de los marcadores utilizados. En cada categoría, se observaron varios patrones de restricción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio es de tipo epidemiológico descriptivo retrospectivo. Se utilizaron 88 aislados clínicos SAMR positivos recuperados por la red de vigilancia bacteriológica del ICGES-LCRSP. Se utilizaron como criterio de inclusión todos los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina identificados en los hospitales de la red de vigilancia epidemiológica como SARM referidos al ICGES-LCRS con información clínica y epidemiológica. Se excluyeron todos los aislados clínicos diferentes de *Staphylococcus*

aureus resistentes a oxacilina, aislados de *Staphylococcus aureus* coagulasa negativos, aislados sin información epidemiológica y aquellos que se contaminaron en el proceso. Los aislados fueron criopreservados a -70°C en medio de leche descremada (skim milk). La pureza de cada aislado fue verificada mediante dos transferencias y crecimientos consecutivos en agar tripticasa y soya. Posteriormente se transfirieron en agar sangre para visualizar la beta hemólisis. Los aislamientos fueron sometidos a pruebas de sensibilidad realizado por el Laboratorio Gorgas. Los antibióticos utilizados fueron penicilina (PEN), oxacilina (OXA), amoxicilina (AMX), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (ERI), clindamicina (CLI), gentamicina (GEN), tetraciclina (TCY), sulfametoxazol-trimetropim (SXT), cloranfenicol (CHL), vancomicina (VAN) y cefoxitina (FOX) (según Normas CLSI, 2018). La presencia del gen *mecA* fue determinada mediante

aglutinación por látex PBP2 y fue realizada en el laboratorio Gorgas.

Extracción de ADN

Las células fueron lisadas según procedimiento descrito por Wichelhaus et al., 1998. Brevemente, se seleccionaron 5 colonias al azar de cultivos frescos de 24 horas de *Staphylococcus aureus* y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 180 µL de buffer de lisis (20 mM tris-Cl pH 8.0, 2mM EDTA sódico, 1.2% triton X-100, lisozima 20mg/ml), 5.7 µL de Lisoestafina (1 µg/µL). Los tubos fueron incubados por lo menos 30 minutos a 37°C. Luego de la lisis se procedió a extraer el ADN utilizando *DNeasy Tissue Kit* (QIAgen) de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante.

Se utilizaron dos pares de cebadores *mecA*1/*mecA*2 Geha et al., (1994) y *mA*1/*mA*2 Yinduo et al., (2007) para corroborar la presencia del gen *mecA*. La amplificación de los genes *coa*, *spa* y la región hipervariable (HVR) del gen *mecA* se realizó con cebadores específicos (Wichelhaus et al., 2004).

En cada reacción de amplificación se utilizó 1 µL de DNA, 5 µL de buffer 10X (Promega), 1 µL (10 µM) de cada cebador, 1.25 µL de mezcla de dNTP's (10 mM), 1 µL de TopTaq DNA polimerasa (QIAgen 1 unidad). El volumen final de la reacción fue de 50 µL. Las condiciones de amplificación para *mecA* fueron 94°C 1 min, 30 ciclos a 94°C 15 segundos, 55°C 15 segundos, 72°C 5 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Las condiciones para *coa* y *spa* fueron 94°C 1 min, 35 ciclos a 94°C 60 segundos, 56°C 60 segundos, 72°C 3 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos mientras

que las de HVR fueron 94°C 4 min; luego 30 ciclos a 94°C 60 s, 55°C 60 s, 72°C 3 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Los productos de la amplificación del ADN fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0.5X TBE conteniendo 1.5 μ L de bromuro de Etidio (10 mg/ml).

Digestión de los amplicones

Se transfirieron a un tubo Eppendorf 5 μ L de cada uno de los productos de amplificación, 5 μ L amortiguador 10X NEB 4 (*New England Biolabs 2013*), 0.5 μ L (10 unidades de *HaeIII* (*New England Biolabs 2013*, Frankfurt, Alemania), 0.5 μ L BSA (100X) en un volumen total de la reacción fue de 50 μ L. La reacción de digestión se realizó a 37°C por tres horas. Los productos de digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE IX conteniendo 1.5 μ L de bromuro de etidio (10mg/ml). La electroforesis se realizó a 120 voltios durante 60 minutos. La visualización de los patrones de restricción se realizó con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta y los resultados fueron documentados con la ayuda de una cámara *Ultracam Digital Imaging* para su posterior análisis.

3. RESULTADOS DETECCIÓN DEL GEN MECA

La resistencia a meticilina se confirmó mediante la amplificación por PCR de una región del gen *mecA* utilizando dos juegos de cebadores diferentes. Los cebadores *mecA1/mecA2* generan un producto de amplificación de 310 pb mientras que los cebadores *mA1/mA2* uno de 280 pb.

Con ambos cebadores se lograron los productos de amplificación esperados en cada uno de los 88 aislamientos. En la figura 1 se observan los productos de amplificación de 280 y 310 pb. Estos resultados validan la caracterización fenotípica inicial realizada en el ICGES-LCRSP.

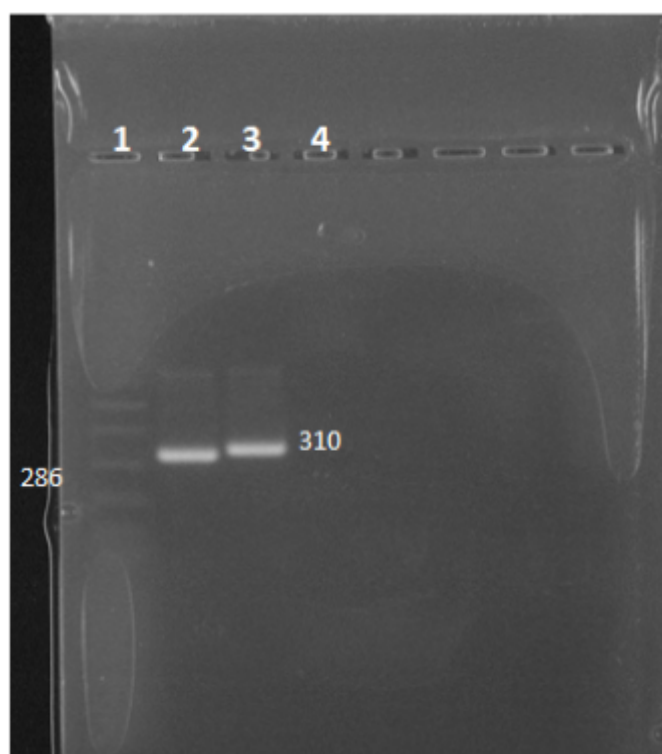


FIGURA 1.
Electroforesis en agarosa al 1% de los amplicones de *mecA*.
Autores.

Carril 1, marcador de peso molecular (100pb. PROMEGA). Carril 2, banda de 280 bp obtenida con *mA1/mA2*. Carril 3, banda de 310 pb generada con *mecA1/mecA2*. Carril 4, control negativo *Escherinchia coli*.

Amplificación del gen *coa*

La amplificación de un fragmento en la región de ADN comprendida entre los cebadores *coa1/coa2* se observó en el 91% (80/88) de los aislamientos. El tamaño del fragmento varió entre 600 a 1000 pb. Los productos generados con este cebador fueron de 600 bp, 700 pb, 750 bp, 800 bp, 850 bp, 900 bp y 1000 bp. En la figura n.º2 se observa el polimorfismo del gen *coa* en las muestras analizadas. En el 6.8% (6/88) no se lograron obtener productos de amplificación mientras que el 2.27% (2/88) de los aislamientos generaron dos bandas. Los aislamientos con bandas dobles fueron el aislamiento n.º11 con productos de 800 y 950 bp y el n.º12 con productos de 750 bp y 900bp. En la mayoría de los aislamientos (79.5%) se obtuvo un producto de amplificación para el gen *coa* de 600 pb (ver figura 2).

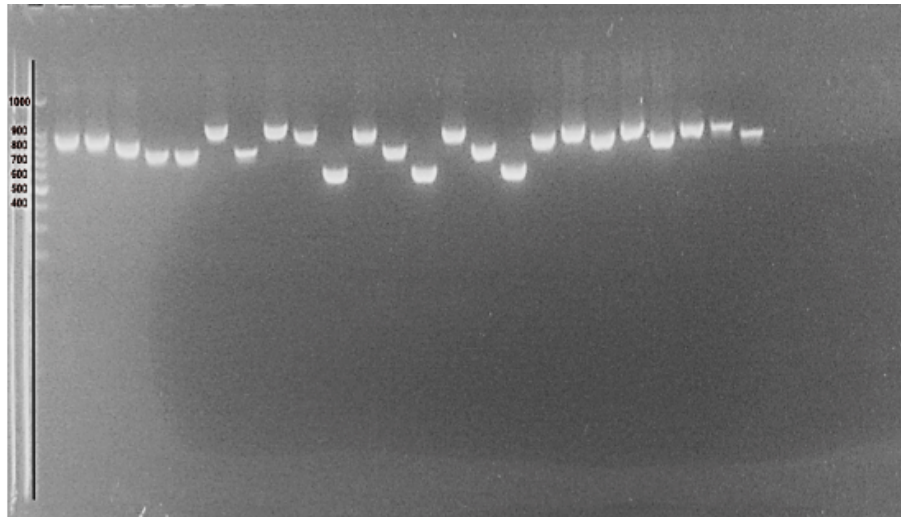


FIGURA 2.
Polimorfismo en el gen *coa*.

Autores.

Se observan bandas desde 600pb. a 1000 pb.

Se logró la amplificación de una región del gen *spa* en 57 de los 88 aislamientos (64.8%). 56/88 (63.6%) de los aislamientos produjeron una banda de 1500 pb. y 1/88 (1.13%) bandas de 1000 y 1200 pb. (Figura n.º3, 31/88 aislamientos no produjeron bandas de amplificación).

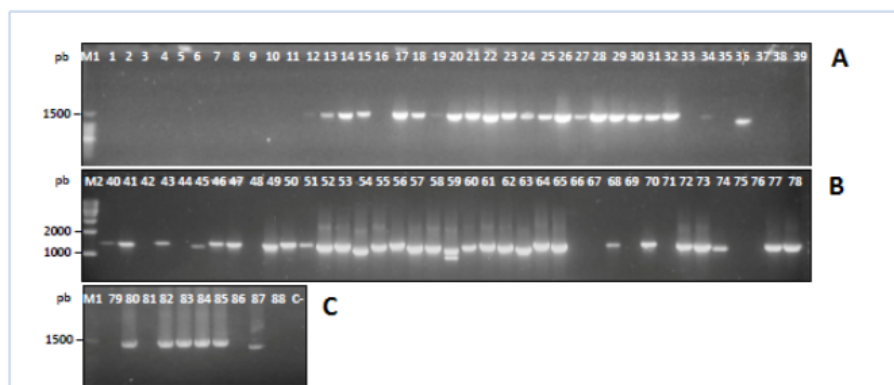


FIGURA 3.
Amplificación del gen *spa*.

Autores.

M, marcador de peso molecular. C, control negativo. (A) Aislamientos 1-39. (B) aislamientos 40-78. (C) aislamientos 79-88.

Amplificación gen HVR

La amplificación de la región hipervariable del gen *mecA* se logró en sólo 33 de los 88 aislamientos (37.5%). El producto de amplificación para esta región en 11 de los 33 aislamientos fue de 550 pb y en los 22 restantes de 600 pb.

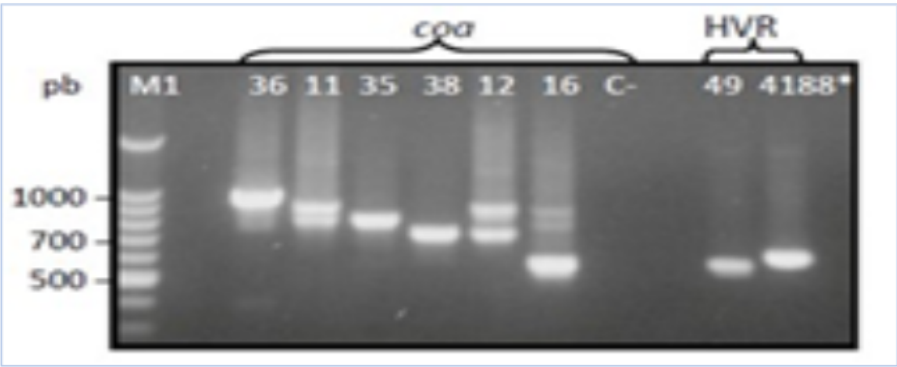


FIGURA 4.
Electroforesis en gel de agarosa mostrando polimorfismo en gen *coa* y en gen (HVR) asociada al *mecA*.
Autores.

M1 representa marcador de peso molecular de 100pb de Promega. C- indica control negativo de PCR utilizando ADN extraído de *E. coli*.

TABLA 1.
Consolidado de los resultados de amplificaciones según gen.

GEN/REGIÓN AMPLIFICADA	MUESTRAS	POSITIVAS
MecA	88	88
<i>coa</i>	88	80
HVR	88	33
<i>spa</i>	88	57

Autores.

RFLP de los productos de PCR de *coa*, *spa* y HVR.

El polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) se realizó en 84 aislamientos, 4 fueron excluidos debido a que no se obtuvo productos de amplificación para ninguno de los tres genes.

Las comparaciones de los patrones de restricción fueron realizadas entre aislamientos en los que se logró la amplificación de los mismos genes. Se establecieron con base en este criterio cinco categorías de comparación. La categoría 1 compuesta por los aislamientos en los cuales amplificaron *coa*, *spa* y HVR. La segunda categoría, aislamientos en los cuales amplificaron *coa* y *spa*. La tercera categoría, aislamientos con amplificación en *coa* y HVR y las categorías cuarto y quinta son los aislamientos en los cuales sólo amplificó (*coa* o HVR). En estos últimos grupos se compararon los patrones de restricción entre aislamientos con amplificaciones para el mismo gen.

En la categoría 1 se generaron 10 bandas polimórficas. Los tamaños de las bandas fueron de 900, 800, 750, 700, 650, 600, 500, 450, 400 y 240 pares de bases (pb).

La presencia o ausencia de estas bandas permitió identificar 19 patrones de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs). Dieciséis de los veinticuatro aislamientos presentaron patrones de restricción únicos. Ocho de veinticuatro presentaron tres patrones diferentes repetidos.

Los tamaños de bandas variaron entre 246 pb y 800pb. (En la segunda categoría, de 25 aislamientos diferentes se observaron 17 fragmentos de restricción RFLP diferentes).

La tercera categoría comprendida por 10 aislamientos con genes (*coa/HVR*) generó 6 patrones de restricción distintos. En la categoría cuarta con sólo 11 aislamientos solamente amplificó *coa* generando 7 patrones de restricción. En la quinta categoría, (*HVR*) generó un patrón de restricción, un aislamiento con 400 pb.

TABLA 2.
Consolidado de resultados.

Categoría	Genes restricción	Patrones de restricción	n.º aislamientos trabajados	Tamaños aprox. pb
Cat 1	<i>spa, coa HVR</i>	19	24	246-900p.b.
Cat 2	<i>coa, spa</i>	17	25	600-1200pb
Cat 3	<i>coa, HVR</i>	6	10	246-750pb
Cat 4	<i>Coa</i>	7	11	246-800pb.
Cat 5	<i>HVR</i>	1	1	550-600pb

Autores.

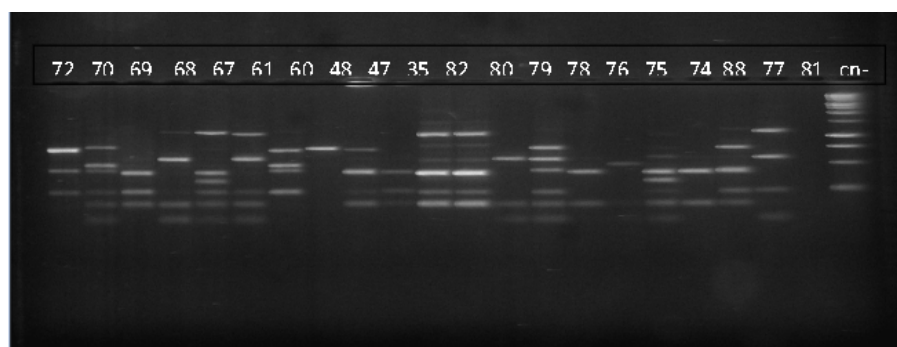


FIGURA 5.
Patrones de restricción de los aislamientos.

Autores.

Electroforesis en gel de agarosa 2% donde muestra los tamaños de bandas que se generaron después de la digestión simultánea de los genes *coa* y *spa* y *HVR*. 81 cn- es control negativo de *E. coli* y el PM escalera de peso molecular 100 pb.

4. DISCUSIÓN

El aumento de cepas de origen hospitalario como de origen comunitario de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina está cambiando la forma de su manejo. Se requiere de una más rápida y confiable caracterización de los aislados para tomar decisiones importantes en cuanto a la implementación de medidas de control y tratamiento adecuado. La tipificación molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina es un componente esencial de un sistema de vigilancia para describir las tendencias epidemiológicas y establecer las estrategias de control.

El antibiograma ha sido desde hace mucho la herramienta principal para determinar muchos brotes hospitalarios. Es una técnica estandarizada y ampliamente disponible que puede ser utilizada con todas las especies microbianas. Su desventaja consiste en la variabilidad de la expresión a la resistencia, que es también susceptible a la inestabilidad por transmisión horizontal y a la pérdida de elementos genéticos extracromosomales (Montesinos et al., 2002).

Diversas técnicas moleculares se utilizan para establecer cuando un aislado recuperado de diferentes pacientes y/o fuentes representan una cepa o una mezcla de cepas.

El RFLP es un método molecular de tipificación muy utilizado en bacterias como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y ha sido comparado por muchos investigadores con el PFGE que es el estándar de oro. En este estudio, se utilizó la metodología *RFLP-PCR* y se logró la caracterización en nuestro país de aislados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, estandarizar y optimizar una metodología de *PCR* para la detección por separado de los genes *mecA*, *coa*, *spa* y *HVR* y utilizar RFLP-PCR para obtener patrones de restricción reproducibles y no ambiguos para todos los aislados examinados.

En nuestro estudio, pudimos confirmar la presencia del gen *mecA* usando dos pares diferentes de cebadores, *mecA1/mecA2* que generaron un producto de amplificación 310pb totalmente compatible con la literatura según investigadores como (Mahmoudi et al., 2016) y un segundo par de cebadores *mA1/mA2* que produjo un producto de amplificación a 280 pb igualmente compatible según datos aportados por investigadores y escritores como (Teruyo et al., 2007). El 100% de los aislados amplificó, de manera que estos resultados corroboran la identificación fenotípica efectuada

mediante antibiogramas, metodología látex prueba de escrutinio para PBP2a realizada en el *ICGES-LCRS* metodología con que se establece resistencia a meticilina en nuestro sistema de vigilancia (Brown et al., 2005).

En cuanto al gen coagulasa, la acotación hecha por Lange et al. (1999) indica que las diferencias en los tipos de clases de bandas de gen coagulasa están sujetas a variaciones geográficas, tiene mucho sentido debido que en el presente estudio sólo encontramos dos tipos de clases de coagulasa diferentes, uno con bandas únicas (78/80) que fue el que fue más frecuente y dos aislamientos con bandas dobles específicamente los aislamientos 11 y 12 de nuestra investigación. Esto contrasta con investigaciones realizadas en un hospital Dirálcae en Egipto por Omar et al. (2014), donde se observaron hasta tres tipos diferentes de bandas siendo la banda doble la más frecuente, seguida por la única y, por último, las triples.

Según Goh et al. (1992), la presencia de dobles bandas que observamos en dos de los aislados sugiere que existe entre nuestras cepas más de una forma alélica del gen coagulasa y que uno de los alelos podría localizarse en el cromosoma bacteriano y el otro en un plásmido o que una de las copias haya surgido por duplicación. Es posible que el cebador anidó en dos regiones generando una doble banda. Este resultado es inusual, tal como lo documentan (Goh et al., 1992 y Schwarzkopf y Karch et al., 1995).

En este estudio se generaron siete tipos de patrones de bandas diferentes del gen *coa* con tamaños desde 600 pb. a 1000 pb., con lo que se evidencia diferencias entre nuestros aislamientos. Investigaciones dirigidas por Ishino et al. (2007) demostraron rangos de tamaño de bandas luego de la amplificación, desde 650 pb a 1000 pb haciendo un leve contraste con nuestros resultados. La banda más común en nuestro estudio fue la de 600 pb. (47.7 %), seguido por el patrón de 800 pb (26.1%). En investigaciones realizadas por Hookey et al. (1998) y Parviz et al. (2016), se generaron productos de amplificación *coa* de 600 pb y 800 pb siendo este último el más común, lo cual contrasta con nuestros resultados.

El polimorfismo genético observado en *coa* puede ser explicado por delecciones o inserciones en donde la región terminal 3' del gen coagulasa que genera diferentes productos de amplificación (Zamani et al., 2007 y Saei et al., 2009).

La digestión del producto de amplificación de *coa* con la enzima de restricción *HaeII* produce 7 patrones de restricción diferentes luego de digestión con *HaeII*, con bandas desde 246pb a 800pb.

Algunos investigadores tales como Frenay et al. (1994), Adesida et al. (2006) y Shakeri et al. (2010), manifiestan que el gen *spa* no se encuentra consistentemente expresado en todos los aislados de los

Staphylococcus aureus. En un estudio africano liderado por Shakeri et al. (2010) se reporta una prevalencia de 5% de *Staphylococcus aureus* sin expresión de proteína A. Cabe destacar que la PCR utilizada en este estudio sólo detecta la presencia de una región del gen por lo que no podemos afirmar que el gen se expresó o no, sólo podemos puntualizar un porcentaje alto de 28.4% de no poder confirmar la expresión de gen spa en nuestros aislamientos.

La presencia de dos tipos de bandas en el gen spa (1400pb y 1200 pb) en el aislamiento 58 debe considerarse como un resultado peculiar, ya que sólo se observó en ese aislamiento. Shakeri et al. (2010), reportó en Irán la presencia también de dos bandas de similar tamaño en el 10.6 % de los aislamientos analizados. Estos investigadores atribuyen la existencia de estas dos bandas a la presencia de dos genes de spa en esos aislamientos. No obstante, Omar et al. (2014), logró reportar un 9.3% de bandas dobles, siendo esta la tercera investigación que reporta cepas de *Staphylococcus aureus* con dos productos de amplificación para spa. La frecuencia de esta banda doble se observó también en aislados de Irán, (Shakeri et al., 2010) con una frecuencia de 10.6%. En nuestro caso, el porcentaje se redujo a 1.13% pero esto puede ser debido a que sólo se caracterizaron 88 muestras en cambio en el estudio de Shakeri et al. (2010), la cantidad fue de 1459 aislados.

Cabe mencionar que tanto Shakeri et al. (2010) como Adesida et al. (2006) reportaron la presencia de aislamientos en los que no se logró amplificar el gen spa considerándolo como un grupo por separado en nuestro estudio no se tomó en cuenta como grupo separado.

En la mayoría de los aislamientos, en los que se logró la amplificación del gen spa se observó sólo una banda de 1500pb, mientras que en el 1.13 % se observó dos bandas dobles entre 1200 a 1400pb. La presencia de bandas múltiples se reportó también en aislamientos en donde se observaron 1, 2 y hasta 3 productos de amplificación con una frecuencia mayor de bandas (Omar et al., 2014). Estos resultados coinciden con los

obtenidos en este estudio y sugieren que la presencia de bandas múltiples es un evento muy poco frecuente. No obstante, Schmitz et al. (1998) observaron a partir de 183 aislamientos 5 tipos diferentes de productos de PCR de gen spa mientras que Montesinos et al. (2002), obtuvieron a partir de 124 aislamientos 4 productos de PCR de diferentes tamaños.

Farria et al. (2008) y Stommenger et al. (2008) demostraron que 99% de los aislamientos de los *Staphylococcus aureus* pueden ser tipificado por PCR por medio de la proteína A, nosotros encontramos que solo 63.6% de nuestros aislados produjeron amplificación con gen spa. Cabe destacar que los amplicones de spa generaron bandas de tamaño muy cercano al esperado (1500 pb). La longitud en el tamaño de la proteína A es de importancia epidemiológica ya que, cuando es muy corta no puede adherirse a la superficie nasal de las células epiteliales y pueden ser eliminadas por respiración, estornudos y hasta por medio de la tos (Fenner et al., 2008).

El polimorfismo de gen spa se explica por la presencia de la región X la cual está localizada en la porción 3' terminal y consta de 24 nucleótidos. La diversidad en la región X es la que causa variación en diferentes proteínas A de *Staphylococcus aureus*, por lo que en nuestras cepas existe poca diversidad en esta región.

La codificación genética de estas dos proteínas, coagulasa (*coa*) y proteína A *Staphylococcus aureus* (spa) han sido los marcadores más ampliamente utilizados como tipificador molecular debido a que ellos contienen unidades polimórficas altamente repetitivas (Frenay et al., 1994). Entre ambos genes, coa y spa se produjeron 17 patrones distintos de restricción, lo que nos indica que la técnica RFLP en el caso de estos marcadores es una técnica reproducible y con gran poder discriminatorio (Afrough et al., 2012). El *PCR-RFLP* como técnica para la caracterización de aislamientos es comparable con el PFGE (Wichelhaus et al., 2001 y Wilailuckana et al., 2006). Mitani et al. (2002) reportaron 10 diferentes de patrones de restricción al digerir una mezcla de los productos de PCR. En nuestro caso identificamos 3 productos de PCR spa (1500pb, 1200pb y 1000pb) y siete productos diferentes de coa (600-1000pb) identificando 17 patrones de restricción diferentes.

La región hipervariable (HVR) adyacente al *mecA* que utilizamos en la investigación fue la más demandante para ser incluida en el estudio. Se logró productos de amplificación de la región hipervariable en 37.5 % aislamientos (33/88) y se obtuvieron

productos de PCR 550 bp en 11 aislamientos y de 600 pb en 22 aislamientos. La presencia de hasta siete productos de PCR de diferentes tamaños han sido observados en otros estudios (Salmenlinna et al., 2001 y Mirkarimi et al., 2016). Los productos de 550 y 600 bp en nuestro estudio se corresponden con dos de los productos de PCR identificados como H1 y H3 (Salmenlinna et al., 2001). Sin embargo, en otros estudios realizados en Brasil se lograron identificar cuatro bandas de PCR utilizando 97 aislamientos (Senna et al., 2001 y Schmitz et al., 1998) con 183 aislamientos lograron identificar 5 bandas de PCR entre sus cepas similar a lo encontrado por (Corrente et al., 2005), en Italia, a partir de 71 aislamientos. No obstante, un total de 10 productos de amplificación diferentes fueron observados en 64 cepas en Bagherzadeh, Irán (Yazdchi et al., 2008).

La caracterización molecular de cepas o aislamientos de importancia epidemiológica requiere de marcadores genéticos capaces de tipificar las cepas analizadas. *HVR*, a pesar de ser de utilidad no es un marcador ideal, ya que no en todos los aislamientos se logró amplificación para esta región. La considerable variación a nivel de secuencia en esta región (*HVR*) explica la incapacidad de anidamiento de los cebadores utilizados en los aislamientos en los que no se observó amplificación. No obstante, la utilización de multiplex PCR con tres cebadores *HVR* reporta amplificaciones en esta región para 99.8 % de las cepas analizadas. Es probable que la utilización de cebadores degenerados en las posiciones que exhiben mayor variación en esta región contribuya también a aumentar la cantidad de aislamientos que generen productos de amplificación de *HVR*.

La restricción de *HVR* con *HaeII* generó una banda de 400pb totalmente comparable con los resultados de (Wichelhaus et al., 2010). El tamaño de *HVR* producto PCR fue 550 pb y 600 pb. Luego de la restricción no observamos productos de 200pb y/o 150 pb, podríamos explicar que esto fue debido a la digestión, generando productos pequeños que no fueron detectados en el gel.

Por primera vez en nuestro país se logró estandarizar una metodología de PCR para la detección simultánea de genes *mecA*, *HVR*, *coa*, *spa*. Además, con la obtención de bandas intensas, fuertes en todos los genes podemos establecer que nuestra metodología escogida para la extracción del ADN genómico fue exitosa. Nuestra técnica

utiliza un método de extracción sencillo y práctico utilizando enzimas líticas y puede ser realizado en un corto tiempo.

Con relación de la restricción de los amplicones *spa*, *coa* y *HVR* por cepa, recolectamos bandas esperadas según protocolo utilizado para nuestro estudio (Wichelhaus et al., 2010), entre dos y siete bandas según el caso lo que hace relativamente fácil su interpretación. Para esta técnica la diferencia en una banda significa que es una cepa diferente. Validamos la observación entre tres y siete bandas luego de la digestión lo que permite su fácil identificación, todo esto compatible con nuestra investigación y compararlas con otros estudios.

El estudio demuestra que el análisis combinado de genes polimórficos utilizando PCR-RFLP es altamente discriminatorio para MRSA.

Finalmente, consideramos que la técnica PCR-RFLP puede ser una herramienta molecular sencilla, rápida, económica y confiable para realizar vigilancia epidemiológica de rutina que nos ayudará a un mejorar la vigilancia, control y tratamiento de infecciones logrando de esta manera evitar en lo posible el incremento de cepas resistentes para los cuales hay medicación hasta ahora disponible.

5. CONCLUSIONES

- Se logró determinar la presencia del gen *mecA* en todos nuestros aislamientos.

- Los diferentes cebadores utilizados para la detección del gen *mecA* fueron efectivos y lograron validar las pruebas fenotípicas realizadas por el ICGES-LCRSP.
- Se logró la amplificación de los genes *coa*, *spa* y HVR.
- Se consiguió reportar en uno de los aislamientos una banda doble con el gen *spa*, siendo el tercer reporte notificado hasta el momento.
- Los cebadores utilizados para amplificar el gen HVR, no fueron adecuados ya que se obtuvieron porcentajes de amplificación bajos.
- Se logró comparar nuestras cepas entre sí y comparar nuestros resultados con otros estudios en otras latitudes del mundo.
- El análisis mediante el uso de RFLP-PCR nos permite discriminar un aislamiento al exhibir patrones específicos de restricción.
- Podemos demostrar rápidamente la prevalencia de diferentes patrones en varias localidades ya sea hospitalaria o de la comunidad, así como conocer las similitudes o diferencias entre aislados estudiados.
- El estudio demuestra que el análisis combinado de genes polimórficos utilizando PCR-RFLP es altamente discriminatorio para MRSA, además de que el RFLP es una herramienta para la vigilancia epidemiológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, I., Ponce, J. (2014). *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. *Revista Cubana de Pediatría*, 84(4), 383-391. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312012000400007&lng=es&tlng=es.
- Adesida, S.A., Likhoshvay, Y., Eisner, W., Coker, O.A., Abioye, O.A., Ogunsola, F.T., Kreiswirth, B.N. (2006). Repeats in the 3' region of the protein A gene is unique in a strain of *Staphylococcus aureus* recovered from wound infections in Lagos, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 5 (20), 1858-1863. <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/8D59E858861>
- Corente, M., Monno, R., Totaro, M., Martella, V., Buonavoglia, D., Rizzo, G., Buonavoglia, C. (2005). Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated at the Policlinic Hospital of Bari (Italy). *New Microbiol*, 28(1), 57-65. <https://www.researchgate.net>
- Faria, N., Carrico, J.A., Oliveira, D.C., Ramirez, M., De Lencastre, H. (2008). Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 136-144. <https://doi.org/10.1128/jcm.01684-07>.
- Geha, D.J., Ujl, J.R., Gustaferrero, C.A. (1994). Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus* in clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7), 1768-1772. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.7>.
- Goh, S.H., Byrne, S.K., Zhang, J.L., Chow, A.W. (1992). Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(7), 1642-1645. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.7>.
- Hookey, J., Richardson, J., Cookson, B. (1998). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase Gene [versión electrónica]. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (4), 1083-1089. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.4>
- Ishino, K., Tsuchizaki, N., Isikawa, J., Hotta, K. (2007). Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 607-609. <https://doi.org/10.1128/JCM.02099-06>.
- Lange, C., Cardoso, M., Senczek, D., Schwarz, S. (1999). Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary microbiology*, 67 (2), 127-141. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00031-0).
- Mahmoudi, H., Arabestani, M., Mousavi, S., Alikhani, M. (2017). Molecular Analysis of the coagulase gene in clinical and nasal carrier isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by restriction fragment polymorphisms. *Journal of global antimicrobial resistance*, (8), 41-45. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.10.007>.

- Mitami, N., Ohnishi, M., Murakawa, K., Okamoto, Y. (2002). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by protein A gene sequencing. *Jpn. J. Infect. Dis*, 55, 179-180. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Mitami, N., Koizumi, A., Sano, R., Masutani, T., Murakawa, K., Mikasa, K., Okamoto, Y. (2005). Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by PCR- RFLP and its Usefulness in an Epidemiological Study of an Outbreak. *Japanese Journal of Infectious Disease*, 58 (4), 250-252. <https://www.niid.go.jp>
- Mirharimi, SF., Hasani, A., Abdinia, B. (2016). High diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates based on hypervariable region polymorphisms. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 4 (4), e36433. <https://doi.org/10.5812/pedinfect.36433>.
- Montesinos, I., Salido, E., Delgado, T., Cuervo, M., Sierra, A. (2002). Epidemiologic Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed Gel Electrophoresis at a University Hospital and comparison with Antibiotyping and Protein A and coagulase gene Polymorphisms. *Journal of clinic Microbioly*, 40 (6), 2119-2125. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6>.
- Omar, NY, Ali, HAS., Harfoush, R. (2014). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates on the basis of protein . and coagulase gene polymorphisms. *International Journal of microbiology*, Article ID 650328. <https://doi.org/10.11155/2014/650328>.
- Parviz, M., Samira, A., Abbas, F., Baharak, N. (2016). Genotyping of coa and aroA genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal samples in Western Iran. *Jundishapur J. Microbiol*, 9 (1), 1-6. <https://doi.org/10.5812/jjm.26480>.
- Palavencino, E., (2004). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clinics in laboratory medicine*, 24(2), 403-418. Importar imagen <https://doi.org/10.1016/j.cll.2004.03.007>.
- Fenner, L., Widmer, F., Dangel, M., Frei, R. (2008). Distribution of spa types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 6-year period at a low –prevalence university hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 57(5), 612-616. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47757-0>. Fifteenth International Supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute/NCCLS, document M100-S15. CLSI, Wayne, Pa, USA.
- Frenay, H.M., Theelen, L., Schouls et al. (1994). Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3), 846-847. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.3.846-847.1994>.
- Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J. (2001) Recongnition of two groups of methicillin- resistant- *Staphylococcus aureus* strains based on epidemiology, antimicrobial susceptibility, hypervariable-region type, and ribotype in Finland. *Journal of Clinical Microbioly*, 39 (6), 2243-2247. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2243-2247.2001>.
- Senna, J.P., Pinto, C.A., Carvalho, L.P. y Santos, D.S. (2002). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the mec hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6), 2254-2256. 10.1128/jcm.40.6. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2254-2256.2002>
- Schwarzkopf, A. (1995). Coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* a new epidemiologic marker. *Inmunitat und infection*, 23(1), 2407-2412. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.10>.
- Shakeri, F., Shojai, A., Golalipour, M., Alang, S., Vaez, H., Ghaemi, E. (2010). Spa Diversity among MRSA and MSSA Strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. *International Journal of Microbiology*, 2010, (ID 351397), 1-5. <https://doi.org/10.1155/2010/351397>.
- Schmitz, M., Steiert, M., Tichy, HV., Hofmann, B., Verhoef, J., Heinz, K., Kohrers, K., Jones, E. (1998). Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. *J. Med. Microbiol*, 47(4) 341-351. <https://doi.org/10.1099/00222615-47-4>.
- Strommenger, B., Bräulke, C., Heuck et al. (2008). “spa typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing.” *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (2), 574-581. <https://doi.org/10.1128/jcm.01599-07>.

- Teruyo, I., Kuwahara, K., Hiramatsu, K. (2007). *Methods in Molecular Biology*. Yinduo J (Eds). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols*. Chapter 7. Humana Press inc.
- Witt, R., Van Belkum, A., Van Leeuwen W. (2011). Molecular diagnostics and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and update. *Clinical Microbiological Diagnostics*, 4(10), 375-380. <https://doi.org/10.1586/ERM.10.34>.
- Whichelhaus, T.A., Hunfeld P., Boddington, B., Kraicz, P., Schafer, V., Brade, V. (2001). Rapid molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP. *Infection & Control Hospital Epidemiology*, 22 (5), 294-298. <https://doi.org/10.1086/501903>.
- Wilailuckana, C., Tribuddharat, C., Tiensasitorn, Pongpech, P., Naenna, P., Rugdeekha, S., Dhiraputra, Ch., Danchaivijitr, S. (2006). Discriminatory powers of molecular typing techniques for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 32(2), 327-334. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>
- Yazdchi, B., Pourmand, MR., Hajiabdolgha, M., Hoseini, M., Mardani, N. (2008). Molecular characterization of hypervariable region (hvr) and antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* strains isolates collected from Tehran University of medical sciences hospitals. *Journal of school of Public Health and Institute of Public Health Research*, 2 (6), 39-48. <http://sjsph.tums.ac.ir/article-1-143-en.html>.
- Yinduo, J. (2007). *Methods in Molecular in Molecular Biology*. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols*. New York, Humana Press.
- Zamani, A., Sadeghian, S., Ghaderkhani, J., Alikhani, MY., Najafimosleh, M., Goodarzi MT et al. (2007). Detection of methicillin-resistance (*mecA*) gene in *Staphylococcus aureus* strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. *Ann Microbiol*, (57), 273-276. <https://doi.org/10.1007/BF03175219>.