



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Asociación entre los criterios de clasificación genotípica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina que se obtuvo mediante electroforesis en geles de campos pulsantes y mediante reacción en cadena de la polimerasa de regiones hipervariables del gen *mecA*

Gustavo Medina<sup>a</sup>, Carola Otth<sup>a</sup>, Pamela Araya<sup>b</sup>, Juan Carlos Hormazabal<sup>b</sup>, Jorge Fernández<sup>b</sup>, Aurora Maldonado<sup>b</sup>, Heriberto Fernández<sup>a</sup>, Laura Otth<sup>a</sup> y Myra Wilson<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Microbiología Clínica (Proyectos DID S-2004-64 y S-2007-63 UACH), Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

<sup>b</sup> Instituto de Salud Pública de Chile, Chile

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 29 de noviembre de 2007

Aceptado el 1 de agosto de 2008

On-line el 9 de abril de 2009

#### Palabras clave:

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Electroforesis en geles de campos pulsantes  
Reacción en cadena de la polimerasa en el gen *mecA*

### RESUMEN

**Introducción:** El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) es un problema epidemiológico en el ámbito mundial.

**Métodos:** Se determinó el grado de asociación entre los criterios de clasificación genotípica que se obtuvieron mediante PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis* 'electroforesis en geles de campos pulsantes') y PCR (*polymerase chain reaction* 'reacción en cadena de la polimerasa') de 7 regiones hipervariables de ácido desoxirribonucleico asociadas al gen *mecA* (PCR RHV-*mecA*) que se aplicaron al análisis de 36 cepas de SARM no relacionadas con brotes epidémicos, aisladas de sujetos que ingresaron en el Hospital Regional de Valdivia, Chile.

**Resultados:** Las cepas se clasificaron en 15 pulsotipos (de la A a la O) y en 5 genotipos (6, 14, 15, 16 y 17) según PFGE y PCR RHV-*mecA*, respectivamente. La mayoría de las cepas se agruparon en los pulsotipos D, E e I que presentaron un porcentaje de similitud del 85,7%. Los genotipos PCR RHV-*mecA* de mayor frecuencia fueron el genotipo 14 (36,1%) y el genotipo 15 (33,3%). Cada uno de los genotipos detectados mediante PCR RHV-*mecA* se distribuyó en más de un pulsotipo. El grado de asociación entre los criterios de clasificación genotípica de PFGE y de PCR RHV-*mecA* se determinó mediante el coeficiente de contingencia y el coeficiente  $\nu$  de Cramer. En ambos se obtuvo un valor cercano a 1 (0,84 y 0,78, respectivamente) que indicaba una alta asociación entre estos criterios, por tanto, se trataría de técnicas complementarias y no excluyentes que pueden aplicarse indistintamente.

**Conclusiones:** La PFGE representa una herramienta molecular de alta tecnología, estandarización y poder discriminatorio; sin embargo, la tipificación por PCR RHV-*mecA* es una herramienta simple, accesible y rápida que a pesar de su menor poder discriminatorio puede utilizarse como alternativa en estudios epidemiológicos de las cepas de SARM.

© 2007 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Association between genotype screening results obtained by PFGE and PCR for hypervariable regions of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

### ABSTRACT

**Introduction:** The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become a major epidemiological problem worldwide.

**Methods:** We determined the degree of association between the genotype screening results obtained by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and polymerase chain reaction (PCR) for 7 hypervariable DNA regions associated with the *mecA* gene (HVR-*mecA* PCR), in the epidemiological analysis of 36 MRSA strains unrelated to nosocomial outbreaks, isolated from hospitalized patients at the County Hospital of Valdivia (Chile).

**Results:** The strains were classified into 15 pulse types (A-O) and 5 genotypes (6, 14, 15, 16, and 17) by PFGE and HVR-*mecA* PCR, respectively. Most of the strains were grouped in pulse types D, E and I, which presented 85.7% similarity. The most common genotypes were 14 (36.1%) and 15 (33.3%). Each genotype

#### Keywords:

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
Pulsed-field gel electrophoresis  
*MecA* gene polymerase chain reaction

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: myrawilson@uach.cl (M. Wilson).

detected by HVR-*mecA* PCR was distributed in more than one pulse type. The degree of association between genotypic screening by PFGE or HVR-*mecA* PCR was determined by calculating Cramer's V statistic and the contingency coefficient. In both cases, a value near 1 (0.84 and 0.78, respectively) was obtained, indicating a high association between these genotypic screenings. Thus these are complementary, not exclusionary techniques that can be equally applied.

**Conclusions:** PFGE is a standardized, high-technology molecular tool with considerable discriminatory power. HVR-*mecA* PCR is a fast, simple, accessible tool that has lower discriminatory power; nonetheless it can serve as an alternative method for epidemiological research in MRSA strains.

© 2007 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

El *Staphylococcus aureus* destaca como el patógeno nosocomial más aislado en el ámbito mundial. Su importancia clínica radica en sus múltiples factores de patogénesis y en sus complejos mecanismos de resistencia, situación que disminuye drásticamente las posibilidades terapéuticas antimicrobianas frente a las cepas resistentes<sup>1</sup>.

En 1961 Jevons reportó en Londres las primeras cepas del *S. aureus* resistente a metilina (SARM)<sup>2</sup>. Luego, durante la década de 1980 estas cepas se extendieron en todo el mundo y alcanzaron cifras de hasta un 40% en cuadros clínicos relacionados con las infecciones intrahospitalarias<sup>3</sup>.

La resistencia intrínseca a metilina se debe a la incorporación en el ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano de un gen estructural denominado *mecA*, que codifica la síntesis de una nueva proteína fijadora de penicilina, llamada PBP2a (*penicillin-binding protein* 'proteína ligada a la penicilina' 2a), que mantiene la integridad de la pared celular cuando los antibióticos betalactámicos inhiben a las PBP habituales. Este gen se localiza invariablemente dentro de un elemento genético móvil denominado SCCmec (*Staphylococcal cassette chromosome mec*) que corresponde a un fragmento de ADN de 21 a 67 kb<sup>4</sup>.

Se han desarrollado diferentes métodos genotípicos de tipificación microbiológica que apoyan el estudio epidemiológico de SARM, la técnica de elección es la PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis* 'electroforesis en geles de campos pulsantes'). Esta técnica utiliza enzimas de restricción que cortan el ADN cromosómico en sitios poco frecuentes. Así, los fragmentos obtenidos se exponen a la influencia de 3 campos eléctricos, uno de éstos es constante y los otros 2 son inconstantes, lo que permite a los fragmentos desplazarse a través de los poros del gel de agarosa<sup>5</sup>.

Como método alternativo de tipificación molecular de las cepas de SARM destaca la genotipificación basada en la presencia de regiones hipervariables de ADN. Estas regiones son factibles de detectar mediante la PCR y así se obtienen patrones de amplificación que permiten clasificar las cepas según el origen clonal<sup>6</sup>.

El objetivo del presente estudio fue determinar el grado de asociación entre los criterios de clasificación genotípica que se obtuvieron mediante PFGE y PCR de 7 regiones hipervariables de ADN asociadas al gen *mecA* (PCR RHV-*mecA*) para comparar el desempeño de estas técnicas en el seguimiento de los genotipos SARM circulantes, tomando en cuenta factores como poder de discriminación, interpretación de resultados, tiempo de realización y costos de equipamiento.

## Material y método

En el presente estudio se incluyeron 36 cepas de SARM que se aislaron consecutivamente por orden de aparición (no relacionadas con brotes epidémicos) y que se recogieron de sujetos que

ingresaron en el Hospital Regional de Valdivia durante el año 2005.

El protocolo de la PFGE que se desarrolla a continuación es una modificación del protocolo original que describieron Bannerman et al<sup>5</sup>.

**Preparación de los bloques:** inocular 5 ml de caldo con la cepa que se genotipificará e incubar a 37 °C durante 2 h. Luego de centrifugar, resuspender el *pellet* en 2 ml de amortiguador PIV (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH = 8,0, NaCl 5 M) y ajustar la concentración de la suspensión bacteriana en una densidad óptima de 1,3 a 1,4 con un filtro de 600 nm. Posteriormente agregar 5 µl de lisostafin (1 mg/ml) a 250 µl de la suspensión bacteriana, incubar a 37 °C durante 10 min y luego agregar 250 µl de agarosa al 1%. Tomar 300 µl de la mezcla y rellenar los pocillos de los moldes de los bloques.

**Lisis celular:** sumergir los bloques en 2 ml de amortiguador de lisis celular más 15 µl de lisozima (10 mg/ml) e incubar a 37 °C durante 2 h. Luego sumergir los bloques en 2,5 ml de amortiguador CLB (Tris 50 mM, EDTA 50 mM pH = 8,0, 1% sarcosyl) más 24 µl de proteinasa K e incubar a 50 °C durante 2 h en agitación constante. Lavar 3 veces con agua estéril y con amortiguador de TE IX (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 1 mM EDTA). Conservar los bloques en amortiguador TE IX a 4 °C.

**Digestión enzimática:** incubar las cepas de SARM a 30 °C durante 4 h con 30 U de enzima Sma I. En el control se debe utilizar la cepa de *S. Branderup* H9812 como patrón universal en la Red PulseNet y digerir con la enzima XbaI a 37 °C durante 4 h<sup>19</sup>.

**Preparación del gel:** preparar 200 ml de agarosa al 1% en TBE (Tris-Borate-EDTA [ethylene diamine tetra-acetic 'ácido edético']) de 0,5X. Ubicar los bloques en la parte inferior de los dientes de la peñeta y luego agregar la agarosa. Una vez que se solidifica el gel, retirar la peñeta y rellenar los pocillos.

**Condiciones de electroforesis:** el tiempo de corrida debe ser de 21 h; el tiempo de pulso inicial de 5 segundos; el tiempo de pulso final de 35 segundos; el voltaje de 6 V/cm; el ángulo de 120° y la temperatura de 14 °C.

**Tinción del gel:** teñir el gel con bromuro de etidio (20 mg/ml) durante 30 min.

**Análisis de datos de la PFGE:** analizar los patrones de corte mediante el *software* Bionumerics y aplicar un índice de tolerancia del 1,8%.

El protocolo de la PCR RHV-*mecA* que se desarrolla a continuación es una modificación del protocolo original que describieron Huygens et al<sup>6</sup> y Wilson et al<sup>7</sup>.

**Iniciadores:** se emplearon 8 sets de iniciadores destinados a detectar 7 regiones hipervariables de ADN asociadas al gen *mecA*. Dichas regiones correspondieron a: HVR, pUB110, Ins117, pT181, pI258 I - II, *mecR1* y IS256, y se identificaron de acuerdo con el tamaño de los productos de amplificación, 300pb, 331pb, 215pb, 255pb, 295-270pb, 406pb y 371pb, respectivamente<sup>6</sup>.

**Recuperación y lisis celular:** las cepas se sembraron en agar tripticasa de soja y se incubaron a una temperatura de 35 °C durante 48 h bajo condiciones aerobias. La extracción de ADN se realizó con ebullición de una colonia resuspendida en 100 µl de agua estéril.

**Amplificación:** la amplificación se llevó a cabo con 2 sets de iniciadores por reacción, por lo que el análisis de una cepa se realizó en 4 reacciones individuales, que fueron las siguientes: a) en la reacción 1 los iniciadores fueron pI258 (I) y mecR1; b) en la reacción 2 los iniciadores fueron pI258 (II) e IS256; c) en la reacción 3 los iniciadores fueron pUB110 y pT181, y d) en la reacción 4 los iniciadores fueron HVR e Ins117. La mezcla de PCR se preparó con 10 µl de célula lisada, 0,2 mM de cada nucleótido de trifosfopiridina (dNTPs), 0,5 µM de cada iniciador, 1 U de *Thermus aquaticus* (Taq) ADN polimerasa, 10 × PCR amortiguador y 1,5 mM de magnesio cloruro en un volumen final de 50 µl.

**Ciclo de amplificación:** el ciclo inicial fue de 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s; el ciclo de extensión final es de 72 °C durante 10 min. Se visualizan los productos de amplificación en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio al 2%. Como control se usó la cepa ATCC 49476 *S. aureus* que posee las regiones hipervariables HVR, pT181, pI258 (I-II), mecR1 e IS256.

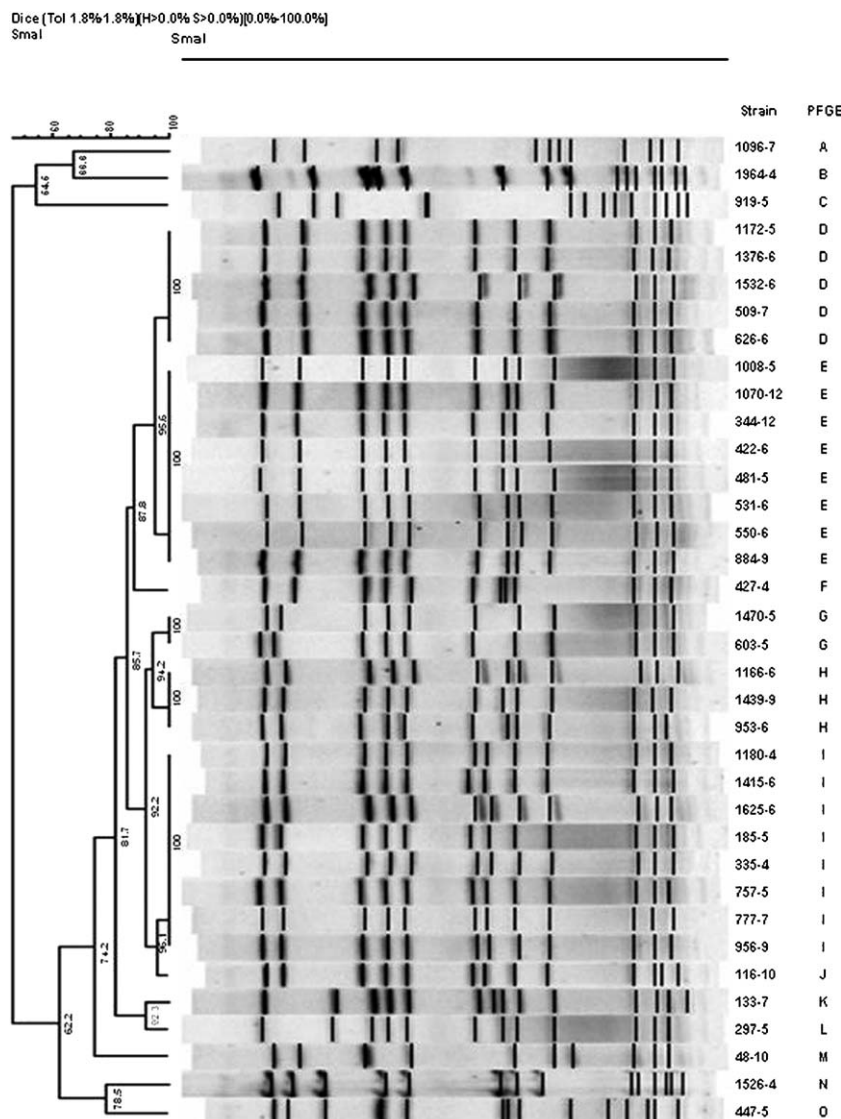
**Análisis estadístico:** se calculó el coeficiente de contingencia y el coeficiente  $\nu$  de Cramer para establecer el grado de asociación entre los criterios de clasificación genotípica que se obtuvieron mediante PFGE y PCR RHV-*mecA* con el software EPIDAD 3.1.

## Resultados

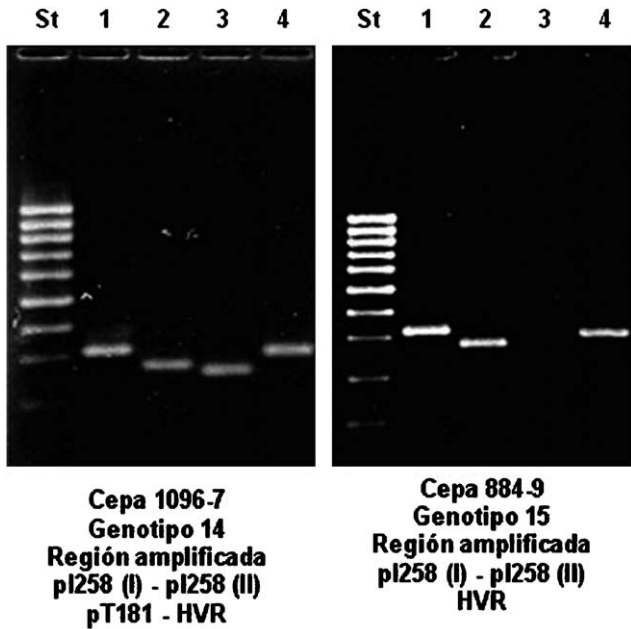
Las 36 cepas analizadas mediante la PFGE se clasificaron en 15 pulsotipos según los patrones de corte obtenidos, a cada pulsotipo se le asignó una letra (de la A a la O) del alfabeto arábico. Como se observa en el dendograma (fig. 1), se distinguen 2 grupos claramente definidos, las cepas que se clasifican en los pulsotipos A, B y C con un porcentaje de similitud del 54,5% y las cepas que corresponden a los pulsotipos D a O que obtuvieron un porcentaje de similitud del 62,2%. La mayoría de las cepas analizadas se agrupó en los pulsotipos D, E e I que presentaron un porcentaje de similitud del 85,7%.

Mediante la aplicación del ensayo PCR RHV-*mecA* se pesquizaron 5 patrones de amplificación denominados como genotipos 6, 14, 15, 16 y 17 según la clasificación de Huygens et al<sup>6</sup> y Wilson et al<sup>7</sup> (fig. 2). Las cepas analizadas sólo presentaron productos de amplificación correspondientes a las regiones hipervariables HVR, pT181, pI258 e IS256. La totalidad de los genotipos que se identificaron concuerda con los genotipos detectados previamente por Wilson et al<sup>7</sup>. Huygens et al<sup>6</sup> detectaron previamente sólo el genotipo 6 (tabla 1).

En la figura 3 se describe el porcentaje de las cepas que amplificaron cada una de las regiones analizadas. Cabe destacar



**Figura 1.** Dendrograma de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina genotipificadas mediante electroforesis en geles de campos pulsantes.



#### Carriles:

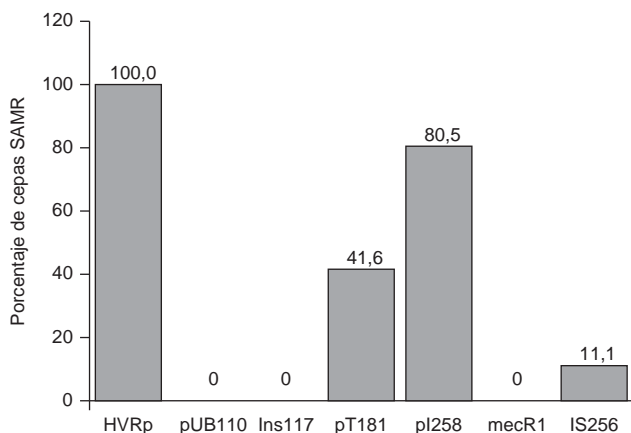
- St: estándar de tamaño molecular 100 pb**  
**1: reacción 1 pI258 (I) - mecR1 (295 - 406 pb)**  
**2: reacción 2 pI258 (II) - IS256 (270 - 371 pb)**  
**3: reacción 3 pT181 - pUB110 (255 - 331 pb)**  
**4: reacción 4 Ins117 - HVR (215 - 300 pb)**

**Figura 2.** Patrones de amplificación de genotipos 14 y 15 obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa de regiones hipervariables de ácido desoxirribonucleico asociadas al gen *mecA*.

**Tabla 1**

Genotipos que se identificaron mediante la PCR de regiones hipervariables de ácido desoxirribonucleico asociadas al gen *mecA* según región hipervariable amplificada

Región hipervariable							
Genotipo	HVR	pUB110	Ins117	pT181	pI258	<i>mecR1</i>	IS256
6	+	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	+	+	-	-
15	+	-	-	-	+	-	-
16	+	-	-	-	+	-	+
17	+	-	-	+	-	-	-



**Figura 3.** Porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina según regiones hipervariables amplificadas.

**Tabla 2**

Número y porcentaje de cepas que se clasificaron mediante electroforesis en gels de campos pulsantes y mediante reacción en cadena de la polimerasa

Pulsotipo (PFGE)	Genotipo (PCR RHV- <i>mecA</i> )					Total	%
	6	14	15	16	17		
A		1				1	2,7
B					1	1	2,7
C		1				1	2,7
D	4			1		5	13,8
E		2	3	3		8	22,2
F			1			1	2,7
G		1	1			2	5,5
H		1	2			3	8,3
I		5	3			8	22,2
J	1					1	2,7
K			1			1	2,7
L		1				1	2,7
M			1			1	2,7
N		1				1	2,7
O					1	1	2,7
Total	5	13	12	4	2	36	
%	13,8	36,1	33,3	11,1	5,5		

PCR-RHV *mecA*: PCR de regiones hipervariables de ácido desoxirribonucleico asociadas al gen *mecA*; PFGE: electroforesis en gels de campos pulsantes.

que la totalidad de las cepas genotipificadas presentó productos de amplificación correspondientes a la región HVR. No se detectaron las regiones pUB110, Ins117 y *mecR1* en ninguna de las cepas analizadas.

En la [tabla 2](#) se observan el número y el porcentaje de las cepas que se clasificaron por medio de PFGE y PCR RHV-*mecA*. Según PFGE, los patrones que agruparon la mayor cantidad de cepas corresponden a los pulsotipos E e I con un 22,2% cada uno. Respecto a la clasificación mediante PCR RHV-*mecA*, el genotipo de mayor frecuencia correspondió al genotipo 14 con un 36,1%, seguido por el genotipo 15 con un 33,3%. El pulsotipo E agrupó a los genotipos PCR RHV-*mecA* 14, 15 y 16, y el pulso I agrupó a los genotipos 14 y 15. Cada genotipo que se detectó por PCR RHV-*mecA* se distribuyó en más de un pulsotipo.

El grado de asociación entre los criterios de clasificación genotípica que se obtuvieron mediante PFGE y PCR RHV-*mecA* entregó como resultado un coeficiente de contingencia de 0,84 y un coeficiente  $\nu$  de Cramer de 0,77. En ambos casos el coeficiente varía entre 0 y 1, el valor máximo 1 indica la *asociación completa* y el valor mínimo 0 indica la *independencia completa*.

## Discusión

En la actualidad, la PFGE se considera la técnica de elección para la tipificación molecular de las cepas de SARM debido a que permite detectar reordenaciones genómicas, cambios evolutivos recientes y además presenta un alto poder de discriminación<sup>12,13</sup>. En relación con este último punto, mediante PFGE se obtuvieron 15 pulsotipos (de la A a la O), en contraste con los 5 genotipos obtenidos mediante PCR RHV-*mecA*<sup>6,14-17</sup> denominados según la nomenclatura que utilizaron Huygens et al<sup>6</sup> y Wilson et al<sup>7</sup>.

Si bien la PFGE se diseñó para aplicarse en el análisis de los brotes infecciosos, en este estudio se analizó la aplicabilidad de PCR RHV-*mecA* como técnica de genotipificación alternativa a la PFGE en el análisis epidemiológico de cepas no aisladas de un brote infeccioso. Es por esto que, al tratarse de las cepas de SARM no relacionadas con un brote, el elevado poder de discriminación que presenta la PFGE puede ser un inconveniente al momento de

realizar un seguimiento epidemiológico, ya que mientras más patrones de clasificación haya, mayor será la dificultad para realizar el seguimiento.

A pesar del menor poder de discriminación que se obtuvo por PCR RHV-*mecA*, su aplicación permite confirmar si el *S. aureus* posee resistencia intrínseca a meticilina, ya que las regiones hipervariables analizadas están contenidas dentro del SCCmec presente sólo en el SARM. De esta manera no se requieren pruebas preliminares que determinen esta condición de resistencia<sup>7</sup>. Esta situación es sin lugar a dudas una gran ventaja ya que la aplicación de PFGE a cepas de SARM requiere necesariamente análisis previos fenotípicos o genotípicos que determinen la resistencia intrínseca a la meticilina.

Al analizar el dendograma y los porcentajes de similitud que se obtuvieron mediante la PFGE, se distinguen 2 grupos: las cepas que corresponden a los pulsos A, B y C, y las cepas que se clasifican entre los pulsotipos D a O. Estos grupos no están relacionados ya que, aunque estas cepas puedan corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es cercana, y es menos probable su relación epidemiológica; por tanto, se infiere que pertenecen a clones distintos. Las diferencias que se observan en los patrones son atribuibles a 3 o más cambios genéticos independientes, lo que origina 6 o más diferencias en los patrones de corte. Esta situación es común entre los aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas y entre los aislamientos no relacionados a brotes epidémicos que están separados por períodos de tiempo prolongados, como en este caso<sup>8</sup>.

Las cepas agrupadas en los pulsotipos D, E e I presentaron un porcentaje de similitud del 85,7%. En este caso, las cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas debido a que difieren en 3 o menos segmentos de corte. Esta situación puede originarse por una mutación espontánea que afecte sólo a un lugar de restricción y cree uno nuevo o haga desaparecer uno ya existente, lo que se traduce en un máximo de 3 diferencias entre los patrones de corte<sup>8</sup>.

Si bien mediante PCR RHV-*mecA* no es posible determinar el grado de similitud entre una cepa y otra, sí es factible determinar el origen clonal al identificar las regiones hipervariables analizadas<sup>6,7</sup>. De acuerdo con esto se puede concluir que la mayoría de las cepas de SARM aisladas de sujetos que ingresaron en el Hospital Regional de Valdivia se originaron de 2 clones pertenecientes a los genotipos 14 y 15.

Las cepas agrupadas en el genotipo 14 se diferencian de las cepas clasificadas en el genotipo 15 debido a que estas últimas carecen de la región pT181, detectada en el 41,6% de las cepas analizadas. Esta región corresponde a una secuencia de ADN plasmidial que está dentro del SCCmec y que codifica la resistencia a tetraciclina<sup>9</sup>. Por tanto, se puede especular que la cepa que originó los clones pertenecientes al genotipo 14 provendría de una cepa perteneciente al genotipo 15 a la que se integró el plásmido pT181.

La región hipervariable HVR corresponde a una secuencia de ADN compuesta por DRU (Direct Repeat Units) que se ubica entre la secuencia de inserción IS431 y el gen *mecA*<sup>10</sup>. Ésta destaca por estar presente en la totalidad de las cepas analizadas, lo que da cuenta de un alto grado de conservación de esta región a través de las sucesivas generaciones bacterianas. Este hecho se correlaciona con la investigación que realizaron Wilson et al en la que esta región se detectó en el 100% de las cepas genotipificadas<sup>7</sup>.

La región pl258, que se amplificó en el 80,5% de las cepas, corresponde a una secuencia de ADN de origen plasmidial que codifica proteínas transportadoras de membrana y resistencia a metales pesados, principalmente el mercurio<sup>11</sup>. Sólo el 11,1% de las cepas analizadas amplificó la región hipervariable IS256, que corresponde a una secuencia de inserción que codifica resistencia a gentamicina y a kanamicina<sup>11</sup>.

Las regiones hipervariables pUB110, Ins117 y *mecR1* no se detectaron en ninguna de las cepas genotipificadas. La región pUB110 corresponde a una secuencia de ADN de origen plasmidial colindante a la región HVR que codifica resistencia a tetraciclina, a kanamicina y a neomicina<sup>12</sup>. La región Ins117 corresponde a una secuencia corta de 117pb que, junto con la secuencia de inserción IS431, permite la inserción del plásmido pUB110<sup>11</sup>.

La región *mecR1*, que se ubica río arriba del gen *mecA*, corresponde a un gen que codifica la síntesis de la proteína *mecR1*, que activa la transducción del gen *mecA* y genera la síntesis de PBP2a<sup>13</sup>. Kobayashi et al señalaron que SARM porta en forma intacta los genes *mecR1*, *mecI* y *mecA*<sup>14</sup>. Posteriormente, Hiramatsu et al reportaron que estos genes se caracterizan por presentar deleciones<sup>15</sup>. Es debido a estas deleciones que probablemente la región *mecR1* no se detectó. Es decir, el no haber detectado amplicones que correspondan a la región *mecR1* no se debe a la ausencia de esta región dentro del SCCmec, sino a una posible delección de la secuencia complementaria al iniciador empleado en la reacción.

La totalidad de los genotipos que se identificaron mediante PCR RHV-*mecA* (6, 14, 15, 16 y 17) concuerdan con los genotipos detectados por Wilson et al<sup>7</sup>, esto puede deberse a que las cepas que se incluyeron en ambos estudios provienen del mismo ambiente, es decir del Hospital Regional de Valdivia. Huygens et al<sup>6</sup> detectaron previamente sólo el genotipo 6, razón por la que se puede inferir que en este medio circulan cepas que difieren de las cepas de SARM australianas.

Una de las características que hace de la PFGE la técnica de elección para el análisis epidemiológico molecular de las cepas de SARM es su alto grado de reproducibilidad, que permite el análisis de los datos interlaboratorios e intralaboratorios<sup>5,16</sup>. Sin embargo, se debe considerar que factores tales como su prolongado tiempo de realización, el alto costo de equipamiento y la necesidad de contar con un alto conocimiento técnico e interpretativo son un problema operativo al momento de su aplicación<sup>8,16</sup>.

Mediante PCR RHV-*mecA* es posible disminuir significativamente el tiempo de realización por tratarse de un análisis directo que no contempla la preparación de *plugs*, lisis celular, digestión enzimática y en el que las 21 h que requiere la corrida electroforética mediante PFGE se reducen aproximadamente a 90 min. Además, el costo de implementación de PCR RHV-*mecA* es considerablemente menor debido principalmente a que la PFGE requiere un número mayor de equipos de alta complejidad<sup>16</sup>.

Asimismo, PCR RHV-*mecA* no requiere un alto conocimiento técnico e interpretativo debido a que no precisa de un posterior análisis computacional de los patrones de amplificación. Basta con agrupar las cepas según la presencia de las regiones hipervariables que se identifican de acuerdo con el tamaño molecular de los amplicones detectados en la corrida electroforética<sup>6,7</sup>.

Otro factor importante para considerar es que las bandas que se obtienen mediante PFGE corresponden a segmentos de ADN de secuencia desconocida, por tanto se desconoce si las bandas del mismo tamaño corresponden al mismo fragmento de ADN<sup>16,17</sup>. En oposición a esto, las bandas de amplificación que se obtienen mediante PCR RHV-*mecA* corresponden a un producto conocido de amplificación, ya que se conoce de antemano la secuencia que se amplificará.

La integridad del material genético es una variable importante en la aplicación de PFGE. Se precisa de ADN intacto ya que las alteraciones en un sitio de restricción puede significar más de un cambio en el patrón de bandas y puede ocasionar errores al interpretar los patrones de corte<sup>8,18</sup>. En cambio, en la realización de PCR RHV-*mecA* se aplican protocolos de extracción de ADN que no contemplan la obtención del material genético intacto ya que no se utilizan enzimas de restricción.

El grado de asociación entre los criterios de clasificación genotípica que se obtuvieron mediante PFGE y PCR RHV-*mecA* se determinó calculando el coeficiente de contingencia y el coeficiente  $v$  de Cramer. Ambos coeficientes muestran un valor cercano a 1 (0,84 y 0,78, respectivamente), lo que indica una alta asociación entre estos 2 criterios de clasificación genotípica. Por tanto, se trataría de técnicas complementarias que se pueden aplicar indistintamente y no de técnicas excluyentes.

De acuerdo a lo planteado, si bien la PFGE representa una herramienta molecular poderosa, de alta tecnología, estandarización y poder discriminatorio, la tipificación por PCR RHV-*mecA* para el análisis genotípico de las cepas de SARM representa una herramienta simple, accesible y rápida que a pesar de su menor poder discriminatorio puede utilizarse como técnica de apoyo para estudios de clonalidad y como apoyo a la investigación epidemiológica de SARM.

### Agradecimientos

Al personal de la Unidad de Desarrollo y Biología Molecular del Instituto de Salud Pública de Chile por su ayuda y apoyo en la ejecución de la técnica PFGE. Además, al Sr. Francisco Marín, docente de la Universidad Austral de Chile, por su ayuda en los análisis estadísticos.

### Bibliografía

- Mandel M. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Madrid: Editorial Médica Panamericana. 1997.
- Jevons M. Celbenin-resistant Staphylococci. *BMJ*. 1961;1:124–5.
- Gil M. *Staphylococcus aureus*: microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev Chil Infectol*. 2000;17:145–52.
- Matsuhashi A, Song M, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1986;167:975–80.
- Bannerman T, Hancock G, Tenover F, Miller J. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1995;33:551–5.
- Huygens F, Nimmo G, Schooneveldt J, Munckhof W, Giffard P. Genotyping of methicillin-resistant *S. aureus* by assaying for the presence of variable elements associated with *mecA*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3093–7.
- Wilson M, Otth C, Medina G, Ottc L, Fernández H. Genotipos de *Staphylococcus aureus* con fenotipo metilino resistente, aislados de pacientes del Hospital Base de Valdivia. *Rev Méd Chile*. 2007;135:596–601.
- Pere C, Coque M, Domínguez M, Vázquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [revista electrónica] [citada 26 Nov 2007]; 18:19–24. Disponible en: URL: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
- Matthews P, Reed K, Stewart P. The cloning of chromosomal DNA associated with methicillin and other resistances in *S. aureus*. *J Gen Microbiol*. 1987;133:1919–29.
- Senna P, Pinto C, Carvalho L, Santos D. Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the *mec* hypervariable region for typing methicillin-resistant *S. aureus*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2254–6.
- Oliveira D, Wu S, De Lencastre H. Genetic organization of the downstream region of the *mecA* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying different polymorphisms of this region. *Antimicrob Agents Ch*. 2000;44:1906–10.
- Pournaras S, Slavakis A, Polyzou A, Sofianou D, Maniatis A, Tsakris A. Nosocomial spread of an unusual methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone that is sensitive to all non- $\beta$ -lactam antibiotics, including tobramycin. *J Clin Microbiol*. 2001;39:779–81.
- Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett*. 1992;298:133–6.
- Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Ch*. 1998;42:717–20.
- Hiramatsu K, Longzhu C, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 2001;9:486–93.
- Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. CDC PulseNet. [Citado 26 Nov 2007] Disponible en: URL: <http://www.cdc.gov/pulsenet/index.htm>.
- Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Takeuchi J. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *S. aureus*. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2690–5.
- Linhardt F, Ziebuhr W, Meyer P, Witte W, Hacker J. Pulsed-field gelelectrophoresis of genomic fragments as a tool for the epidemiological analysis of *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol Lett*. 1992;95:181–6.
- Hunter S, Vauterin P, Lambert-Fair M, Van Duyn S, Kubota K, Graves L, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: Converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1045–50.