



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“Caracterización genética y
antibiotipo de cepas de
Staphylococcus aureus resistente a
metecilina (SARM) aisladas de la V
región de Chile, durante el período
2017 – 2019”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

Camila Quintana Barria

Directora de tesis: Dra. Carmen Aravena

**Codirectoras de tesis: Dra. Rosa del
Campo Dra. Jenny Llanos**

NOVIEMBRE / 2021



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“Caracterización genética y
antibiotipo de cepas de
Staphylococcus aureus resistentes
a meticilina (SARM) aisladas de la
V región de Chile, durante el
período 2017 – 2019”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

Camila Quintana Barria

Directora de tesis: Dra. Carmen Aravena

**Codirectores de tesis: Dra. Rosa del
Campo Dra. Jenny Llanos**

NOVIEMBRE/2021



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Caracterización genética y antibiotipo de cepas de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina (SARM) de aisladas de la V región de Chile, durante el período 2017 – 2019”

Alumno

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de las Dras. Carmen Aravena, Dra. Jenny Llanos y Dra. Rosa del Campo en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad de Valparaíso, Chile e IRYCIS, España y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Iván Montenegro Dra. Helia Bello Dra. Jocelyn Gahona Presidente Comisión
Profesor Informante Profesor Informante

Dr. Carmen Aravena
Directora de Tesis

**Viña del Mar, Chile
2021**

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

2

Agradezco a toda persona que participo de forma directa o indirecta para la

realización de la investigación, al programa Magister en Ciencias Médicas mención Biología celular y molecular por permitirme participar a pesar de tener una carrera de pregrado con menor afinidad, en relación con otras para su postulación, a mis tutoras Dra. Carmen Aravena, Dra. Rosa del Campo y Dra. Jenny Llanos y docentes del programa por su dedicación, disposición, paciencia y vocación. Agradezco al docente Dr. Mario Párraga por su colaboración en momentos donde la tesis se observó interrumpida por la alerta sanitaria causada por la enfermedad COVID-19, facilitando su avance y finalización.

Agradezco a CONICYT, laboratorios de Universidad de Valparaíso, Instituto de Ramón y Cajal de investigación sanitaria, ISP, a Alejandro Joyas del Hospital Dr. Gustavo Fricke y Dr. Rodrigo Cruz del Hospital Carlos Van Buren por brindarme la posibilidad de recolectar cepas para investigación y realizar el área técnica de la investigación.

Agradezco a mi pareja Cristóbal Del Mar, mi futuro hijo, mis suegros y mi familia por apoyarme en este nuevo paso y logro durante mi desarrollo como persona y profesional, sin ellos, no lo habría logrado.

También me gustaría agradecer a miembros de los laboratorios donde se realizaron las actividades de tesis, quienes me brindaron colaboración, apoyo y ayuda durante mis estadías en sus instalaciones.

Finalmente, agradecer a mis compañeros de generación, con quienes compartimos y nos apoyamos mutuamente durante esta etapa, donde nunca faltaron los ánimos y hubo trabajo en equipo.

A todos los guardo con cariño y agradezco su aporte en la investigación, la cual he logrado finalizar gracias a todos ustedes.

ABREVIATURAS

AC: Adquisición comunitaria

ACME: del inglés "arginine catabolic mobile element"

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AH: Adquisición hospitalaria

Agr: Accesory gen regulator

CC: Complejo Clonal

Ccr: Del inglés "cassette chromosome recombinase"
 CIM: Concentración mínima inhibitoria
 CoNS: Coagulase-negative *staphylococci*
 PFGE: Electroforesis en gel en campo pulsado (del inglés Pulsed Field Gel electrophoresis)
 ETA: Toxina exfoliativa A (del inglés, "Exfoliative Toxin A")
 IS: Secuencias de inserción (del inglés "insertion sequences")
 ISP: Instituto de Salud Pública
 LA: Utilizado para referirse a infecciones asociadas a ganado, ejemplo "SARM-LA", (del inglés "livestock-associated")
 MEC: Matriz extracelular
 MLST: Del inglés "Multilocus sequence typing"
 MSCRAMMs: Del inglés "microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules"
 NI: No identificada
 NT: Referido a cepas que no reaccionaron con primers utilizados, quedando como no tipificables
 PB: Pares de bases
 PBP: Enzimas transpeptidasas que participant en el entrecruzamiento del peptidoglucano (del inglés Penicillin Binding Protein)
 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés "Polymerase Chain Reaction")
 PIA: Del inglés "Polysaccharide intracelular adhesin"
 PG: Peptidoglucano
 PT: Pulsotipo
 PTs: Pulsotipos

4

PVL: Leucocidina de Panton-Valentine (del inglés Panton-Valentine Leucocidine)
 ORFs: Marcos abiertos de lectura (del inglés "Open reading frames") OS-MRSA: Oxacilline susceptible-methicilin resistant *S. aureus*
S. aureus: Staphylococcus aureus
 SASM: *S. aureus* sensible a meticilina
 SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
 SE: Del inglés "*staphylococcal* enterotoxin"
 SCCmec: *Staphylococcal* chromosomal cassette *mec*
 ST: Secuenciotipo
 TN: Transposones

					5
ÍNDICE					
Contenido	Número	de	Página	1.	RESUMEN
.....				9	2.
INTRODUCCIÓN					10
2.1 Características generales de <i>Staphylococcus aureus</i>					10
2.2 Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>					11
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (SARM)					13
2.4 Mecanismo de resistencia a metilina.....					15
2.4.1 Cepas OS-SARM, una excepción.....					18
2.5 Caracterización genética de cepas SARM					19
2.6 Diferentes cepas SARM					

.....	20
2.6.1 SARM-AH	21
2.6.2 SARM-AC	23
2.7 Situación en Latinoamérica y Chile respecto a SARM.....	25
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
4. OBJETIVO GENERAL.....	27
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
6. METODOLOGÍA.....	28
6.1	Aspectos
generales.....	28 6.1.1
Cepas control.....	28
6.1.2 Recolección de cepas	
.....	29 6.1.3 Criterios de
inclusión y exclusión	29
6.2 Cultivo de cepas	29
6.3 Extracción de ADN.....	30
6.4 Cuantificación de ADN	30
6.5 Confirmación genética cepas SARM y límite de detección de genes <i>spa</i> y <i>mecA30</i>	
6.5.1 Electroforesis en gel de agarosa	32
6.6 Metodología por objetivo específico	32
6.6.1 Objetivo específico 1. Identificación del fenotipo de resistencia antibiótica de las cepas SARM	32
6.6.2 Objetivo específico 2. Determinación del tipo de cassette cromosomal estafilocócico de resistencia a meticilina de las cepas SARM confirmadas	33
	6
6.6.3 Objetivo específico 3. Detección de la presencia del gen codificante para el factor de virulencia leucocidina de Pantón-Valentine en cepas SARM	34
6.6.4 Objetivo específico 4. Determinación de la relación genética entre las cepas SARM mediante MLST y PFGE.....	35
6.6.4.1 Protocolo PFGE.....	35
6.6.4.2 Protocolo MLST.....	36 6.7
Análisis estadístico	37 6.8
Proyecto	37 7.
RESULTADOS	38
7.1 Objetivo específico 1. Identificación del fenotipo de resistencia antibiótica de las cepas SARM	38

7.2 Objetivo específico 2. Determinación del tipo de cassette cromosomal estafilocócico de resistencia a meticilina de las cepas SARM confirmadas	41
7.3 Objetivo específico 3. Detección de la presencia del gen codificante para el factor de virulencia leucocidina de Panton-Valentine en cepas SARM	44
7.4 Objetivo específico 4. Determinación de la relación genética entre las cepas SARM mediante PFGE y MLST.....	46
8. DISCUSIÓN	54
9. CONCLUSIONES	62
10.BIBLIOGRAFÍA	63
11.ANEXOS	69

Lista de figuras Número de página	
Figura 1: Propuesta de modelo por Tromp <i>et al</i> , 2020 (12) para la interacción de PVL célula y la formación del poro.....	12
Figura 2: Estructura de la penicilina, meticilina y cloxacilina	14
Figura 3: Límite de detección de ADN. Muestra el resultado de 2 geles de agarosa utilizados para la electroforesis posterior a PCR en genes <i>mecA</i> y <i>spa</i>	72
Figura 4: Susceptibilidad antimicrobiana.....	40
Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa mPCR para tipo de cassette <i>SCCmec</i> en cepas SARM	41
Figura 6: Distribución de los antibiotipos según tipo de <i>SCCmec</i> en cepas SARM	43
Figura 7: Imagen de resultado gen <i>pvl</i>	44
Figura 8: Dendrograma de PFGE y características genotípicas, fenotípicas y demográficas de cepas SARM (n=44)	47
Figura 9: Distribución de los antibiotipos de resistencia antibiótica en los pulsotipos mayoritarios (PT5, PT16, PT18 y PT20) de cepas SARM	50

Lista de tablas Número de página	
Tabla 1: Tipos de <i>SCCmec</i>	17
Tabla 2: Cepas control utilizadas en el estudio, relacionada a su objetivo de uso y origen	28
Tabla 3: Programa m-PCR óptimo para detección genes <i>spa</i> y <i>mecA</i>	31
Tabla 4: Programa termociclador PCR para tipo de <i>SCCmec</i>	33
Tabla 5: Cepas control utilizadas para la reacción mPCR y resultados esperados para los	

diferentes tipos de cassette SCCmec	34
Tabla 6: Programa de PCR para gen <i>pvl</i>	34
Tabla 7: Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas SARM (n=44)	39
Tabla 8: Tipos y frecuencias de SCCmec identificados en cepas SARM (n=44)	42
Tabla 9: Prevalencia del gen <i>pvl</i> en cepas SARM (n=44).....	44
Tabla 10: Integración global de características genotípicas de cepas SARM humanas aisladas en la región de Valparaíso (n=44)	51

1. RESUMEN

Introducción: La resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* (SARM) surgió en la década de los 1960 tras la adquisición del gen *mecA*. Mundialmente SARM es causante de infecciones, pudiendo ser multirresistente a los antibióticos y tener factores de virulencia como la Leucocidina de Panton-Valentine, aumentando su patogenicidad. En la región de Valparaíso, Chile, existe escasa información de las cepas SARM circulantes, el objetivo del estudio fue la caracterización genética y antibiotipo de cepas aisladas en Valparaíso entre los años 2017, 2018 y 2019.

Métodos: Se estudiaron 44 cepas SARM humanas aisladas de diferentes centros de salud y comunidad entre 2017-2019 en la región de Valparaíso, en las que se determinó su antibiotipo mediante difusión en discos de agar, la concentración inhibitoria mínima inhibitoria (CIM) para vancomicina, el genotipo mediante presencia de los genes *pvl* y tipo de SCCmec (I-IV) por PCR y la relación clonal por PFGE y MLST. El análisis estadístico se realizó con el programa MyStat, por medición de frecuencias y test de Fisher ($p=0,05$).

Resultados: Detectamos doce antibiotipos, destacando uno con resistencia solo a β

lactámicos y otros dos con resistencia de cuatro a cinco tipos de antimicrobianos (β lactámicos, macrólidos, lincosamidas, quinolonas y aminoglucósidos). El gen *pvl* se detectó en el 84,1% de cepas independiente del tipo de SCCmec. Las cepas estudiadas se agruparon en 19 pulsotipos incluyendo los complejos clonales CC1, CC5, CC8, CC30 y distinguiendo los genotipos ST5-I-*pvl*⁺, ST8-IV-*pvl*⁺, ST5-I-*pvl*⁻, ST8-I-*pvl*⁺, ST105-II-*pvl*⁺, ST30-IV-*pvl*⁺, ST225-II-*pvl*⁺, ST5-II-*pvl*⁻, ST5-II-*pvl*⁺, ST5-IV-*pvl*⁺, ST225-I *pvl*⁻, un ST no descrito y 4 cepas no tipificables.

Conclusiones: La mayor parte de cepas SARM analizadas presentaron multirresistencia antibiótica y el gen *pvl*. Los principales genotipos fueron ST5-I-*pvl*⁺ del CC5, cepas equiparables al clon USA300 del CC8 y al clon chileno/cordobés del CC5.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, PFGE, SCCmec, caracterización genética, Leucocidina Pantón-valentine

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características generales de *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* agrupa bacterias cocáceas Gram positivas, y actualmente está compuesta por 51 especies, las cuales se dividen en 2 ramas, los estafilococos coagulasa negativos (CoNS) y los que presentan enzima coagulasa (coagulasa positivo), la cual le brinda al estafilococo la capacidad de convertir el fibrinógeno en fibrina, generando coágulos (1), en estas últimas está a *S. aureus* (2). Este microorganismo forma parte de la microbiota de alrededor de un 20-30% de la población (2), ubicándose en piel y mucosas, siendo la nariz un reservorio común (3). Está asociada a altas tasas de morbimortalidad cuando produce infecciones a la piel y tejidos blandos, como infección de heridas o infecciones más invasivas, como endocarditis, osteomielitis, síndrome de shock tóxico, septicemia y meningitis, entre otras (4), con las cuales se compromete la vida del paciente. Las bacterias de la especie *S. aureus* se transmiten por distintas vías, como son, alimentaria, por contacto persona a persona y contacto indirecto y también por gotitas de usuario con infección respiratoria (5,6).

Entre las características microbiológicas de *S. aureus* está la morfología de sus colonias redondas, lisas, elevadas, con colores amarillos o dorados por los pigmentos carotenoides, y en el microscopio utilizando tinción de Gram se visualizan como

agrupaciones en forma de racimo de uva (1). Es una bacteria anaerobia facultativa (7), que posee la enzima catalasa, propiedad se utilizada en el laboratorio para diferenciarla de *Streptococcus* y *Enterococcus* (1), puede crecer en temperaturas desde los 10°C a 40°C, se ha documentado que es una bacteria halófila capaz de crecer a concentraciones de cloruro de sodio de entre un 7-10%(8,9), en medios con 5-9 de pH y se multiplica a una actividad del agua (abreviada como "Aw") a un valor mínimo de 0,93 favoreciendo su presencia en alimentos (9).

Al ser una bacteria Gram positiva, posee una gruesa pared que la protege del medio ambiente y evita su lisis osmótica. Para sintetizar dicha pared, en la cara exterior de la membrana plasmática se ubican las enzimas transpeptidasas que catalizan el entrecruzamiento del peptidoglucano, las también denominadas PBPs (6).

10

2.2 Factores de virulencia de *S. aureus*

En *S. aureus* se han identificado diferentes factores de virulencia que le confieren características patógenas, se pueden destacar:

- Factores que promueven la adherencia a superficies de *S. aureus* es la proteína A, proteína de superficie codificada por el gen *spa* que está conservado en la especie *S. aureus* (4,10), le confiere a la bacteria la capacidad de evadir al sistema inmune, a través de la unión al receptor Fc de las inmunoglobulinas para inhibir el reconocimiento por parte de los neutrófilos (1).
- Toxinas estafilocócicas, entre ellas se presentan:
 - Hemolisinas, entre las cuales están la alfa, beta, gama y delta (3). ○
 - Leucocidinas, destacando la leucocidina Pantón Valentine (PVL), la cual puede adquirirse en *S. aureus* por bacteriófagos. En el hospedero PVL puede actuar como un superantígeno, es causal de necrosis y leucolisis y es codificada en la bacteria por dos genes que componen *pvl* que corresponden a *lukS-PV* y *lukF PV* (3,4,10,11). La PVL se compone principalmente por dos cadenas de polipéptidos, el S (Proteína de elución lenta) y F (Proteína de elución rápida), su mecanismo de acción es mediante la formación de poros en la membrana celular de leucocitos, provocando inestabilidad osmótica en la célula objetivo, liberando su contenido interno, afecta a neutrófilos, quienes al poseer enzimas lisosomales son liberadas al medio extracelular, provocan daño en el tejido del hospedero (1). Una vez en la bacteria, se puede transferir a otras bacterias de la misma especie en plásmidos y está asociada a infecciones de piel y tejidos blandos (10). Se ha descrito *lukS-PV* se une al receptor C5aR1 presente en neutrófilos (figura 1A), no obstante aún no

está claro que genera la unión de *lukF-PV*, antiguamente se relacionaba que la unión de *lukS-PV* al receptor hC5aR1 gatillaba la dimerización de *lukF-PV*, posteriormente formarían un octámero alternando los componentes S y F y formando un poro barril- β en la membrana del neutrófilo (figura 1A), no obstante, hoy en día se ha postulado que mientras *lukS-PV* se une al receptor hC5aR1, *lukF-PV* se uniría de manera simultánea a receptores hCD45 en neutrófilos para la formación del octámero (figura 1B), sin embargo, aún está en estudio (12).

11

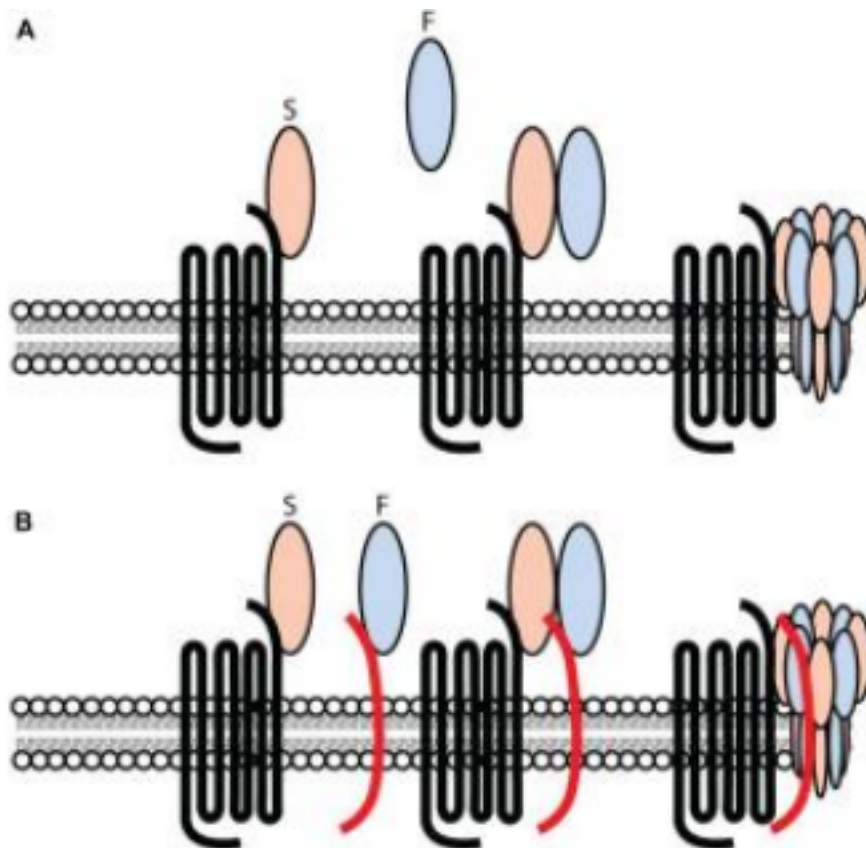


Figura 1: Propuesta de modelo por Tromp *et al*, 2020 (12) para la interacción de PVL-célula y la formación del poro. Extraída desde Tromp *et al*, 2020 (12). S: *lukS-PV*, F: *lukF-PV*. En negro se observa el receptor hC5aR1. En rojo el receptor hCD45.

- Toxina del síndrome de shock tóxico, "TSST-1, codificada por el gen *tst* (3,4,11), es un superantígeno de riesgo vital que genera una respuesta inflamatoria provocando un estado de shock, hipotensión, fiebre, y rash cutáneo, entre otros (4).
- Toxinas exfoliativas con actividad serina proteasa, rompen las adherencias de

los desmosomas afectando a desmogleína I (1), se identifican la A y B, siendo la A la que provoca el "Síndrome Estafilocócico de la piel escaldada" y es codificada por el gen *eta* (1,4).

- o Enterotoxinas estafilocócicas abreviadas SE identificando a SEA, SEB, SEC, SED y SEE (3), las enterotoxinas son termorresistentes y también resisten a la

12

acción de enzimas gástricas y yeyunales, su importancia radica en intoxicaciones asociadas a alimentos generadas por *S. aureus* (13).

- Catalasa, enzima conservada en la especie, mencionada previamente, que le confiere protección frente al peróxido de hidrógeno (1).
- Coagulasa, enzima que favorece la agregación de *S. aureus*, encapsula a la bacteria protegiéndola de la fagocitosis de leucocitos al convertir el fibrinógeno en fibrina, esto favorece la formación de abscesos en el hospedero donde la bacteria queda encapsulada en una capa de fibrina (1).

Es importante mencionar que cada aislado de *S. aureus* puede presentar distintos virulotipos según sus factores de patogenicidad, exceptuando por la presencia constante de proteína A, coagulasa y catalasa (siendo la proteína A específica de la especie) (3).

En relación a la resistencia a antimicrobianos, a medida que *S. aureus* ha sido expuestas a antimicrobianos, se han seleccionado cepas que contienen mecanismos de resistencia y multirresistencia a ellos (10). Esta situación ha dificultado el tratamiento y estado del paciente produciendo infecciones persistentes, aumentando el riesgo de morbimortalidad y la diseminación de la bacteria; es por lo anterior que en infecciones producidas por *S. aureus* se distinguen cepas *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM) y *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) (3).

2.3 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

SARM es un linaje que surgió en la década de 1960 como consecuencia del uso de meticilina para el tratamiento de cepas resistentes a penicilina, tanto la meticilina como la penicilina son parte de la familia de antibióticos β -lactámicos (10). Los antibióticos β -lactámicos se caracterizan por poseer un anillo betalactámico en su estructura, el ácido 6-aminopenicilánico al cual se unen algunos radicales químicos generando diferentes antibióticos. El mecanismo de acción de los β -lactámicos consiste en inactivar a las proteínas PBPs mediante una unión covalente entre el anillo betalactámico y la PBP a través de un residuo de serina (formando un complejo acil enzima), esto se debe a que la conformación del anillo betalactámico es homólogo al

dipéptido D-alanina-D-alanina (sustrato de las PBPs), siendo antagonista en su unión y como consecuencia, se afecta la formación de la pared bacteriana por la inhibición del

13

entrecruzamiento del peptidoglucano (6). Cepas *S. aureus* poseen enzimas betalactamasas con actividad penicilinasas (6,14), con capacidad de hidrolizar la unión covalente entre anillo betalactámico y la PBP, inactivándolos y por lo tanto, inhibiendo la acción del β -lactámico; y por ello se crearon los β -lactámicos-semisintéticos con diferencias estructurales en sus grupos radicales, con mayor peso molecular y resistentes a la hidrólisis de las betalactamasas por impedimento estérico. En estos β lactámicos sintéticos destaca la meticilina y las isoxazolil-penicilinas (cloxacilina, oxacilina, flucloxacilina) que son molecularmente comparables (figura 2) (6).

Figura 2: Estructura de la penicilina, meticilina y cloxacilina. Extraída desde Aguayo-Reyes A. *et al*, 2017 (6).

Posterior a la creación de los β -lactámicos sintéticos surgieron cepas resistentes que se diseminaron y generaron diferentes clones SARM en el mundo, siendo su presencia a nivel mundial, desde 1980 hasta la actualidad, como consecuencia del uso excesivo de antimicrobianos y su eliminación al medio ambiente (10).

La diseminación y adquisición de SARM puede ser de manera intrahospitalaria, a los que se denominan con "SARM-AH" o también se pueden adquirir de manera ambulatoria en la comunidad, llamadas "SARM-AC" (15). Debido al abuso de antibióticos en animales de ganado para alimentación, se han aislado cepas asociadas a ganado, "LA-SARM", su transmisibilidad al ser humano está aún en estudio (10). A su vez, se han descrito diferencias genéticas en cepas según origen de los aislamientos (4,6,10,16), a su vez, existen diferencias en las características de SARM según zona demográfica en donde es aislada y en la medida que se ha diseminado se han observado variaciones genéticas en diferentes zonas del mundo (6,10,16). En Chile la predominancia de infecciones por SARM es principalmente hospitalaria, sin embargo existen casos por contagio comunitario (5,6).

Las cepas SARM no sólo presentan resistencia a la mayor parte de

14

betalactámicos, también suelen presentar resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas, sin embargo, tienden a conservar la sensibilidad a ceftarolina y ceftobriol (10). En España, se realizó un estudio para caracterizar las cepas SARM-AC aisladas de una residencia de ancianos, encontrando altas tasas de resistencia a levofloxacin, gentamicina, tobramicina y clindamicina (5). En Irán se han reportado cepas SARM con resistencia a ciprofloxacino, tetraciclina, eritromicina y clindamicina en trabajadores de la salud y pacientes hospitalizados (3). Se identifican distintos antibiotipos con multiresistencia en las cepas SARM según origen de aislamiento y lugar geográfico (15).

Existen diferentes métodos para caracterizar el antibiotipo, entre ellos el método de difusión con sensidiscos en agar (2,3). En Chile ISP (Instituto de Salud Pública) realiza la técnica de difusión en sensidiscos en agar según las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) testeando la sensibilidad a penicilina G, oxacilina, cefoxitina, ceftarolina, vancomicina, teicoplanina, clindamicina, eritromicina, ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, minociclina, tigeciclina, sulfametoxazol-trimetoprim (cotrimoxazol), rifampicina, linezolid, quinupristina dalfopristina, entre otros (15). Considerando que, dentro de las opciones terapéuticas para tratar infecciones por SARM están la vancomicina y cefalosporinas de quinta generación (6). En diferentes infecciones por *S. aureus* previo al resultado del cultivo microbiológico y antibiograma, en forma empírica se utilizan antibióticos según naturaleza de la infección y características del usuario, como la eritromicina y clindamicina para infecciones cutáneas o en usuarios alérgicos a β -lactámicos (17).

2.4 Mecanismo de resistencia a meticilina

S. aureus posee 4 tipos de PBPs sin sitios alostéricos: PBP1, PBP2, PBP3, y PBP4; cada una participa en distintos procesos de la síntesis y entrecruzamiento del peptidoglucano. Por otra parte, las cepas resistentes a meticilina se caracterizan por la adquisición del gen *mecA* que codifica una PBP2 distinta, denominada "PBP2a" con un peso de 78 kDa y con baja afinidad por el anillo betalactámico, confiriéndole así resistencia antibiótica a la bacteria que la posee, por lo que no se forma el intermediario acil-enzima (6,10). La PBP2a está compuesta por 3 dominios, un dominio transpeptidasa, uno transmembrana y otro dominio de no-unión a penicilina que

15
presenta un sitio alostérico, el cual al ser estimulado por el PG en producción, provoca en la proteína un cambio conformacional, permitiendo la unión exclusiva al peptidoglucano, evitando así la unión de otra molécula al dominio de "no-unión a β

lactámicos”, sus primeros 2 dominios mantienen su actividad normal, por lo cual no se interviene en la formación de capa de peptidoglucano (6,10).

El gen *mecA* puede detectarse en varias especies del género *Staphylococcus* (18), es parte del *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* (6,10), abreviado como *SSCmec*, y es necesario que la cepa SARM lo posea para codificar a PBP2a. *SSCmec* es una unidad genética móvil que facilita su transferencia entre distintas bacterias, a partir de lo cual se ha propuesto que su origen fue desde otra especie de *Staphylococcus* (6,10), posiblemente *S. sciuri* (10,19,20) o *S. fleurettii* (6,10,19,20).

El gen *mec* constituye una familia de isoenzimas que agrupa a los genes *mecA*, *mecB*, *mecC* y *mecD*, sin embargo, no todos han sido detectados en SARM, siendo el más común el *mecA* (10). A su vez existen alelos de gen *mecA*, entre ellos están los *mecA1* y *mecA2*, caracterizados por tener una similitud nucleotídica mayor al 70% y menor al 95% del gen *mecA* original (10). Similar a *mecA*, se han identificado casos de SARM en que ha sido negativa su identificación genética debido a la presencia de un homólogo descrito como gen *mecC*, ubicado en el mismo *SSCmec* y que codifica un producto peptídico similar al PBP2a codificado en el gen *mecA* (con un 63% de similitud en sus aminoácidos) (10). El gen *mecC* presenta alelos *mecC1* y *mecC2*. Existen otros homólogos al gen *mecA*, descritos como *mecB* y *mecD* (con un 60% y 61% de similitud nucleotídica a *mecA* respectivamente), identificados principalmente en otras especies, aunque se han descrito casos de SARM negativos para *mecA* y positivos para dichos homólogos. El gen *mecD* brinda resistencia a toda la familia de antimicrobianos β -lactámicos y difiere en su ubicación dentro del genoma bacteriano, en todos los homólogos el producto al cual codifican es similar a la PBP2a, conservando los 3 dominios (10).

Al presente se han identificado 14 tipos distintos de *SSCmec*, con genes que le confieren a la bacteria resistencia a otros antimicrobianos, dicho cassette se divide en 3 principales zonas que incluyen distintos genes (10,21) (tabla 1): **-Complejo gen *mec*:** Contiene el prototipo de gen *mec*, componentes regulatorios de la resistencia a meticilina (*mecI* y *mecR*) y secuencias de inserción (IS) o transposones (Tn) que se ubican de manera anterior al gen *mec* o posterior a él. Existen 5 clases del

complejo gen *mec* según el gen *mec* y distribución de los otros genes que lo componen (10).

-Complejo gen *ccr*: En él se ubican los genes *ccr* que codifican para recombinasas sitio específicas que le permiten al cassette *SSCmec* integrarse al cromosoma bacteriano y regular su movilidad, también contienen los sitios ORFs, a los cuales no se les ha determinado su función a la fecha. Se han descrito los prototipos *ccrA*, *ccrB* y

ccrC; los cuales poseen sus respectivos alelos, obteniendo en la combinación de diferentes genes un total de 9 complejos gen *ccr* (10).

-Regiones J o "joining regions": Actualmente existen 3 según su ubicación dentro del SCC*mec*, J1, J2 y J3 (10); pueden contener genes que codifican para resistencia a diversos tipos de antibióticos (como macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos), transposones, genes de integrasa, variando de uno a otro tipo (10).

A partir de la conformación de los distintos complejos del SCC*mec*, se han descrito y clasificado distintos SCC*mec* (tabla 1), que difieren en la composición de sus complejos, en la integración de secuencias o transposones, ubicación de los genes.

Tabla 1: Tipos de SCC*mec* con *mecA* y *mecC* (6,10,22)

Tipo de SCC <i>mec</i>	Complejo gen <i>mec</i>	Estructura del complejo gen <i>mec</i>	Tipo de complejo gen <i>ccr</i>	Estructura complejo gen <i>ccr</i>
I	Clase B	IS1272- Δ <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> IS431	1	<i>ccrA1</i> , <i>ccrB1</i>
II	Clase A	<i>mecI</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> IS431	2	<i>ccrA2</i> , <i>ccrB2</i>
III	Clase A	<i>mecI</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> IS431	3	<i>ccrA3</i> , <i>ccrB3</i>
IV	Clase B	IS1272- Δ <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> IS431	2	<i>ccrA2</i> , <i>ccrB2</i>
V	Clase C2	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	5	<i>ccrC1</i>
VI	Clase B	IS1272- Δ <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> IS431	4	<i>ccrA4</i> , <i>ccrB4</i>
VII	Clase C1	IS431- Δ <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> IS431	5	<i>ccrC1</i>
VIII	Clase A	<i>mecI</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> IS431	4	<i>ccrA</i> , <i>ccrA4</i> , <i>ccrB4</i>
IX	Clase C2	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	1	<i>ccrA1</i> , <i>ccrB</i>
X	Clase C1	IS431- Δ <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> IS431	7	<i>ccrA1</i> , <i>ccrB</i>
XI	Clase E	<i>blaZ</i> - <i>mecC</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	8	<i>ccrA1</i> , <i>ccrB3</i>
XII	Clase C2	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	9	<i>ccrC2</i> , Δ <i>ccrA1</i>
XIII	Clase A	IS431- <i>mecI</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> -IS431	9	<i>ccrC2</i>
XIV	Clase A	<i>mecI</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> IS431	5	<i>ccrC1</i>

Basado en Aguayo *et al.* 2018, Lakhundi *et al.* 2018 y Urushibara *et al.* 2020.

IS: Secuencias de inserción

blaZ-mecI-mecR1: Genes regulatorios de la expresión de PBP2a(23)

ccr: Genes que codifican recombinasas

ΔGenes truncados

El primer tipo de SCC*mec* fue descrito en 1999 en una cepa SARM-AH, conteniendo sitios ORFs sin función determinada, al igual que los tipos I y III (10). Además, el cassette tipo III que contiene dentro de sus componentes transposones que codifican para resistencia a cadmio, a su vez contiene en su zona J3 genes que codifican para resistencia a eritromicina (macrólido) y espectinomicina (10). El SCC*mec* tipo IV se caracteriza por ser el más corto y contener principalmente gen *mecA*, se ha asociado principalmente a cepas SARM-AC (10,16,21). El SCC*mec* tipo V posee regiones ORFs sin función conocida, al igual que el tipo IV no posee genes de resistencia adicionales al *mecA* (10). Los tipos I, II y III se han descrito principalmente en cepas SARM-AH, mientras los IV y V se relacionan a SARM-AC a nivel mundial (10), a pesar de ello se debe considerar el contexto del usuario al cual se le aisló la cepa para determinar el tipo de aislamiento de la misma, si es que este fue comunitario u hospitalario, debido a que se han reportado casos de cepas con características de SARM-AC pero con un aislamiento correspondiente a SARM-AH y viceversa (10,21,24). Las actividades del presente estudio se enfocará en detectar los más prevalentes a nivel nacional y mundial los SCC*mec* I-IV, que son los más comúnmente detectados internacionalmente (10,21).

2.4.1 Cepas OS-SARM, una excepción

Se ha documentado como principal causante de la resistencia a meticilina la proteína PBP2a, sin embargo, se han identificado cepas sensibles a oxacilina, pero resistentes a meticilina, denominadas "OS-SARM", a pesar de que ambos antibióticos son similares, la aparición de dichas cepas son un misterio, debido a que poseen el gen que *mecA* y codifican la proteína PBP2a, sin embargo, se desconoce la causa de su sensibilidad a oxacilina. Una diferencia que se ha estudiado entre cepas SARM y OS SARM, se relaciona con la formación de biofilm, en donde las cepas SARM resistentes a oxacilina generan un biofilm con mayor potencia en relación con las OS-SARM que poseen un biofilm intermedio (25).

2.5 Caracterización genética de cepas SARM

Inicialmente, para detectar a las cepas SARM, se realizan estudios en base a sus características fenotípicas, el antibiograma, en donde se identifica una cepa *S. aureus* resistente a la meticilina con pruebas de susceptibilidad frente a la oxacilina y cefoxitina, la resistencia a meticilina se confirma detectando el gen *mecA* por PCR como estándar de oro (15). Posteriormente se realizan estudios genotípicos a través de técnicas genéticas moleculares, esto permite estudiar el origen y relación de las cepas, su diseminación y evolución a través del tiempo (10,15), lo cual permite una vigilancia epidemiológica activa de las cepas, estudiar brotes, identificar, controlar infecciones nosocomiales de manera oportuna y evitar su diseminación (26). Entre las técnicas usadas:

-Tipificación de genes mediante PCR: La reacción en cadena de la polimerasa "PCR", amplificando exponencialmente el fragmento de un gen a partir de la acción de una enzima ADN polimerasa termorresistente y utilizando los primers del gen de interés delimitando su amplificación, generando amplicones de ADN doble hebra, volviéndolos detectables y analizables en un gel de agarosa en una PCR de punto final. Técnica base para realizar diversos análisis como por ejemplo, permite la identificación de los tipos de cassette *SCCmec* y otros genes tales como los que codifican factores de virulencia (27). A su vez, permite la tipificación del gen *spa* en *S. aureus*, mediante una PCR inicial, posteriormente el producto se secuencia y determina un alelo de dicho gen en las cepas analizadas, permitiendo analizar relaciones filogenéticas, es un método más económico que el MLST y es utilizado en estudios epidemiológicos locales (10,28).

-PFGE: Para analizar los distintos linajes genéticos bacterianos se utiliza la PFGE, permite analizar fragmentos de ADN bacteriano de hasta 1000 kb previo a una digestión con enzimas de restricción, siendo una técnica gold estándar para el tipado genético de SARM tras la digestión con la enzima *SmaI* (10). En la electroforesis por PFGE la dirección de los campos eléctricos cambia de forma intermitente, permitiendo la separación de los fragmentos según su tamaño, obteniendo como resultado un perfil de fragmentos de ADN que permite tipificar y relacionar genéticamente cada cepa con el resto de cepas analizadas al incluir los perfiles obtenidos en un programa informático (10,27). Tiene limitaciones económicas debido a los precios de reactivos a

19
utilizar y equipo especializado, el requerimiento de protocolos estrictos para el manejo del ADN y de la realización de la técnica, la cual a pesar de ello, es reproducible en distintos laboratorios en cuanto a los resultados obtenidos, sin embargo, diferencias en su realización afecta a las bandas conseguidas y con ello al perfil (10).

-MLST: En español tipificación multilocus de secuencias es una técnica que permite establecer las divergencias o similitudes genéticas entre cepas bacterianas de una misma especie, lo realiza a través del análisis de la secuencia nucleotídica de fragmentos de 7 genes *housekeeping* propios de la especie y compara los cambios que ocurren en la secuencia nucleotídica de ellos. Los genes utilizados codifican para proteínas que forman parte del metabolismo de la especie *S. aureus*, entre ellos se presentan *arc* (Carbamato quinasa), *aro* (Shikimato deshidrogenasa), *glp* (Glicerol quinasa), *gmk* (Guanilato quinasa), *pta* (Fosfato acetiltransferasa), *tpi* (Triosafofato isomerasa) e *yqi* (Acetil coenzima A acetiltransferasa) (10). De forma técnica, en primera instancia se realiza una PCR de la secuencia parcial de cada gen, consiguiendo fragmentos de 450-500 pares de bases (10), los cuales se secuencian y luego se determinan los distintos alelos de cada gen, obteniendo un perfil de ellos generando una combinación designando un secuenciotipo (ST) determinado. Actualmente se pueden obtener los datos de dichos ST vía digital en sitios libres para la comunidad científica (10).

2.6 Diferentes cepas SARM

Las diferencias en la microbiota se observan tanto a nivel individual como a nivel geográfico y *S. aureus* no ha sido la excepción, con caracterizaciones en diferentes zonas del mundo y evolucionando en su distribución (10). La propagación de SARM ha sido de manera internacional entre países desde un mismo continente, como intercontinental a su vez, acompañado de la evolución en las cepas de un sector geográfico a otro, con aparición de nuevas cepas (10). El surgimiento de nuevas cepas SARM provenientes de distintos lugares geográficos, observándose diferencias en la susceptibilidad antimicrobiana, la presencia o ausencia de genes como el *pvl* y variaciones en el tipo de cassette *SSCmec*. Existen además diferencias entre los *SCCmec* detectados a nivel intrahospitalario y comunitarios a nivel internacional, siendo el tipo IV en general identificado a nivel comunitario y los tipos I y III a nivel

20

hospitalario (AH) (3,6).

En Latinoamérica se han identificado distintos clones de SARM, con distintos *SCCmec*, la utilidad de conocer los distintos clones de las cepas es la epidemiología asociada y por lo tanto, el control de ellas, permitiendo establecer, si existe mayor diseminación de un clon dentro de un área en un tiempo determinado, la posibilidad de brotes epidémicos y su origen (10). Las cepas SARM detectadas en Latinoamérica se destacan por pertenecer a los CC5, CC8 y CC30 (29). En el caso del CC5 se identifican

el clon pediátrico (SARM-ST5-IV), new york/japón (SARM-ST5-II, con susceptibilidad a glicopéptidos, linezolid, sulfametoxazol-trimetoprim, gentamicina y rifampicina), el clon brasilero (SARM-ST239-III), multirresistente pero con susceptibilidad a vancomicina, tigeciclina, linezolid y daptomicina, el chileno/cordobés (SARM-ST5-I)(10,29,30). En Chile destaca el clon chileno/cordobés se ha asociado como SARM-AH, a su vez, es también multirresistente a antimicrobianos, con susceptibilidad a glicopéptidos, linezolid, sulfametoxazol-trimetoprim, minociclina y rifampicina (29).

Entre los antecedentes de las características de cepas SARM que circulan en Chile, se reportaron en Valdivia cepas SARM-AH con los tipos de SCCmec I y IV en un 97% de un total de 100 cepas aisladas (27), siendo detectados los ST5 y ST8 principalmente (27).

Finalmente, un clon que se ha extendido internacionalmente, es el USA300, el cual pertenece al CC8, siendo ST8-IV positivo al gen *pvl*, se ha documentado como susceptible a clindamicina, rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprim y tetraciclina, en ocasiones se han observado casos de resistencia intermedia a vancomicina (10).

2.6.1 SARM-AH

Las cepas SARM-AH es una subclasificación de cepas SARM que se asocian a aislamientos hospitalarios, dichas cepas son agentes productoras de infección asociada a la atención en salud (IAAS) (15), que ocurren cuando el usuario esta posterior a sus 48 horas de hospitalización o *“tiene factores de riesgo como hemodiálisis, cirugía, hospitalización en el año previo, historia de aislamiento de SARM, catéter permanente o dispositivo percutáneo”* (15). Las IAAS, consisten en procesos infecciosos que se adquieren durante la atención en un centro de salud, donde la infección no está en su periodo de incubación en el usuario hasta antes de concurrir al centro de atención de salud (incluyendo a centros de atención ambulatoria y cerrada), es por ello que su

21
diagnóstico considera el tiempo de incubación del microorganismo patógeno, por lo tanto, este puede ser durante la atención o posterior al alta del paciente (15). En Chile el manejo de las IAAS ha progresado a través del tiempo, al estar afiliadas a los procesos de atención, son altamente prevenibles y controlables, en el presente son vigiladas activamente con personal dedicado, a través del “Programa Nacional de Control y prevención de infecciones asociadas a la atención en salud”, conocido como PCI. La introducción del PCI ha logrado disminuir la tasa de IAAS entre un 30% a un 50% en 10 años (31), sin embargo, han aparecido cada vez más agentes patógenos resistentes, entre los cuales se presenta el SARM, su mayor pick fue en el periodo del 2008-2009 (31), el cual se ha controlado a través de los años. Entre las IAAS asociadas

a SARM se presentan infección de sitios quirúrgicos, bacteriemias y neumonía asociada a ventilación mecánica (5,6).

En el continente americano el 2018 en SARM-AH se describieron como principales tipos de *SCCmec* los I, II y III (10).

En un estudio realizado en un hospital de la ciudad de Valdivia, en el sur de Chile (publicado el año 2013), se identificaron cepas de adquisición hospitalaria SARM ST5-I-*pvl*⁻, SARM-ST5-IV-*pvl*⁺, SARM-ST8-IV-*pvl*⁺ y SARM-ST8-IV-*pvl*⁻ (27). En el estudio anterior, junto a uno realizado el año 2008 en Venezuela, se reportaron cepas SARM resistentes a eritromicina, clindamicina, gentamicina y ciprofloxacino, ocasionalmente a rifampicina (27,32).

En otro estudio realizado el 2016 en un hospital en Irán a pacientes y trabajadores del área de la salud, se reportaron casos de cepas resistentes a tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacino y clindamicina, la totalidad de las cepas sensibles a vancomicina, además, se identificaron casos de cepas SARM *pvl* positivas y el cassette *SCCmec* más común fue el tipo III (3). A su vez en dicho estudio entre los ST detectados se presentaron cepas ST859-III-*pvl*⁻, ST859-II-*pvl*⁻, ST6-I-*pvl*⁺, ST6-IV *pvl*⁺, ST639-III-*pvl*⁻, ST343-III-*pvl*⁻ y ST239- III-*pvl*⁺.

En Palestina, cepas SARM aisladas desde hospitales, entre los años 2015 a 2017, en donde la resistencia a antibióticos, incluyó a la familia de los β -lactámicos, junto con otros tales como eritromicina (macrólido), clindamicina (lincosamida), gentamicina (aminoglucósido), entre otros, sin embargo la totalidad de las cepas estudiadas eran sensibles a vancomicina (4), entre los tipos de *SCCmec* predominaron los tipos I y IV, estos últimos por presentar tipo IV fueron definidos dentro del estudio

22
como SARM-AC (4).

En un estudio publicado el 2017 realizado en Nuevo México, Estados Unidos, analizaron cepas SARM-AH aisladas de pacientes adultos, para la caracterización se usó PFGE y se identificó la presencia de los genes *pvl* por PCR, entre otros, incluyendo las características de los usuarios; las cepas predominantes correspondían a los linajes USA100 y USA300 (24).

En resumen, existe una caracterización de cepas SARM-AH causantes de IAAS, donde se han visto los *SCCmec* tipos I, II y III, sin embargo, no es excluyente de situaciones hospitalarias con cepas con características genéticas asociables a SARM-AC como la presencia del *SCCmec* tipo IV o la presencia del gen *pvl* (10).

2.6.2 SARM-AC

Las cepas SARM-AC son causal de infecciones adquiridas en la comunidad (11),

se identificaron por primera vez en 1980 y al igual que las AH se han diseminado mundialmente (10). Generalmente se asocia a infecciones en partes blandas, como heridas o causando abscesos, también se ha relacionado a situaciones de neumonía necrotizante (20).

Las cepas SARM-AC muestran diferencias genéticas en relación a las SARM-AH, reflejado en características fenotípicas, como son su resistencia a menor cantidad de antibióticos el tipo de *SCCmec*, principalmente es el tipo IV (10) y en menor medida los tipos V y VII (20). Se ha descrito como marcador de ellas la presencia del gen de virulencia que codifica para la PVL (10) con una positividad sobre un 75% en cepas SARM-AC (33), sin embargo hoy en día existen reportes de cepas hospitalarias con dicha característica, siendo objeto de debate (10,24).

Entre los clones reportados en Estados Unidos, se ha identificado como predominante la cepa "USA300" caracterizada genéticamente por ser ST8-IVa, *pvl* positiva, ACME positiva, originalmente reconocida como cepa de adquisición comunitaria, sin embargo, ha sido aislada en centros hospitalarios dentro de Norteamérica (10,20). En infecciones AC es una cepa que se aísla en sitios extra nasales y se asocia a casos de endocarditis, neumonía y fascitis necrotizante y como infecciones AH se ha asociado a infecciones al torrente sanguíneo (10). Por otra parte, se ha identificado en el norte de Sudamérica la presencia de una variante del clon

23

USA-300, denominado "USA300-LV", la cual se diferencia en el subtipo de *SCCmec* siendo el tipo IVc y ACME negativa (27).

En Chile existen distintos reportes de SARM en los últimos años, entre el 2012-2013 en un hospital de la Región Metropolitana se detectaron 4 casos pediátricos de SARM-AC (11,31). Las infecciones adquiridas en comunidad de *S. aureus* tienden a relacionarse como infecciones a la piel y tejidos blandos (10) y se han ligado a resistencia a menor cantidad de antibióticos (10), uno de ellos comparable con la meticilina, la cloxacilina, antibiótico β -lactámico utilizado en infecciones estafilocócicas (6).

El ISP (Instituto de Salud Pública de Chile) realizó una vigilancia epidemiológica activa de los SARM-AC, analizando cepas de *S. aureus* obtenidas en todo el territorio nacional, en el período 2012 a 2016. Obtuvieron 1.079 cepas *S. aureus*, se confirmó que un 90,2% de ellas fue SARM. A dichas cepas se les realizó confirmación microbiológica entre las cuales se presentaron pruebas bioquímicas y sensibilidad antimicrobiana (15). Para la confirmación de cepas SARM-AC utilizaron el método de difusión en agar con sensidisco de cefoxitina, junto a la detección de los genes *mecA* y

pvl, por PCR y caracterización por PFGE (15). Entre las regiones con mayor porcentaje de SARM-AC enviadas al ISP, la V región ocupa el tercer lugar con un 3,7% (36 bacterias) de un total de 973 cepas SARM-AC a nivel nacional, con resistencia a cefoxitina, eritromicina y ciprofloxacino, entre otros. Es importante destacar que en dicho período se observó un aumento de las cepas SARM-AC analizadas por el ISP, comenzando en el año 2012 con 103 cepas confirmadas como SARM y en 2016 con 318 cepas (15). En el mismo proceso de vigilancia, en el periodo 2012-2013 se tipificaron 59 cepas SARM-AC *pvl*⁺ y mediante MLST, se observó un predominio del ST8 (54,2%), seguido de ST30 (15,3%) (15), en dichos análisis no se contempló la tipificación del *SCCmec*.

Finalmente, en SARM-AC el gen *pvl* es utilizado como marcador, a pesar de ello en Chile se han identificado casos SARM-AC *pvl* negativos (11). En Palestina, un estudio realizado en cepas aisladas de hospitales, un 86,6% resultó presentar el *SCCmec* IV, por lo cual se les fue clasificadas como comunitarias, de la totalidad de las cepas en estudio 29,5% eran *pvl* positivas, de esas cepas un 100% presentó *SCCmec* IV (4).

24

2.7 Situación en Latinoamérica y Chile respecto a SARM

SARM es un problema a nivel mundial, con diferencias de prevalencia geográficas (6). Este microorganismo forma parte de la microbiota comensal del ser humano, existiendo portadores sanos, lo que favorece la transmisión y por lo tanto, la diseminación de clones con diferente patogenicidad importados desde otras zonas geográficas o bien la posibilidad de surgimiento de nuevos clones desde las cepas ya circulantes (6,10). En este sentido, es importante tener datos actualizados sobre la epidemiología de SARM, por ejemplo, en Chile, han incrementado las inmigraciones desde el 2010 y el 2016 se pesquisó que un 4,35% de la población que vive en el país son extranjeros residentes, con anterioridad, el año 2002 el porcentaje de extranjeros en Chile correspondía al 1,27% de la población, con un aumento de aproximadamente 3 veces en el período. Los datos del último CENSO indicarían que el 4,35% del total de inmigrantes residentes, el 69,2% corresponden a individuos de países sudamericanos, entre los que se presentan con un 25,2% de personas nacidas en Perú, Colombia con un 14,1%, Venezuela con un 11,1%, Bolivia con 9,9% y Argentina con un 8,9% (34), lo que se cómo se mencionó, podría aumentar la diversidad fenotípica y genotípica de cepas SARM circulantes ya sea de individuos portadores y las que producen infecciones.

En Chile existe un programa de vigilancia de infecciones y epidemiología, en términos legales estaba regulada por el decreto N°158 hasta abril del año 2020, en la actualidad por el decreto supremo 7 (35,36) en este último se estableció la vigilancia

de SARM-AC, sin embargo, el Instituto de Salud Pública realizaba en años previos vigilancia de dicha cepa y las cepas SARM-AC, confirmando la resistencia a meticilina y determinando las características genotípicas y de resistencia antibiótica (15). Por otra parte, también se realiza una vigilancia de bacterias resistentes a antimicrobianos, norma técnica N°175, la cual ha sido modificada en el tiempo, estableciendo el envío al ISP de manera obligatoria de cepas *S. aureus* que presenten resistencia intermedia o como tal a vancomicina y aquellas con resistencia a cloxacilina aisladas de hemocultivos. Además desde el 2019, incluye también a aquellas *S. aureus* de cualquier origen si son aisladas de un paciente con colonización o infección por enterococo resistente a vancomicina (37).

En relación al programa de vigilancia nacional de SARM-AC del ISP se ha

25
evidenciado el aumento progresivo de cepas infecciosas SARM-AC que han sido enviadas para su análisis, en él se contempla la caracterización de la resistencia a antibióticos y del gen *pvl*, entre otros (15). A pesar de que se estudió la susceptibilidad a antibióticos en el programa, se debe considerar que es una cepa que está en constante cambio (5). Por ello es importante conocer las similitudes y diferencias que podrían presentar las cepas actuales de SARM. En la región de Valparaíso, siendo la segunda región más poblada del país (34), hay diferentes centros hospitalarios de alta complejidad como el Hospital Dr. Gustavo Fricke, Hospital Carlos Van Buren, Clínicas privadas, etc. donde se han aislado bacterias SARM que producen infecciones en pacientes, sin embargo, se desconoce las características de dichas cepas y por otra parte, se aíslan a su vez bacterias SARM de infecciones comunitarias. A pesar de que el ISP realiza vigilancia epidemiológica de cepas *S. aureus* acorde al marco legal actual, este no incluye a la totalidad de cepas SARM, sumado a que están en constante cambio y evolución, desconociendo cuales son las características fenotípicas u genotípicas de las cepas SARM causantes de infecciones en pacientes que acuden a diferentes centros asistenciales de la región.

Por lo previamente descrito, nació la pregunta de investigación para la presente tesis, ¿Cuáles son las características del antibiotipo y del genotipo de cepas SARM aisladas en la región de Valparaíso (V región) de Chile durante el período 2017-2019?

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las características del antibiotipo y del genotipo de cepas SARM aisladas en la V región de Chile durante el período 2017-2019?

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos y las características genéticas de cepas SARM, aisladas en la V región durante el período 2017-2019.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificación del fenotipo de resistencia antibiótica de las cepas SARM 2.
Determinación del tipo de cassette cromosomal estafilocócico de resistencia a meticilina de las cepas SARM confirmadas
3. Detección de la presencia del gen codificante para el factor de virulencia leucocidina de Panton-Valentine en cepas SARM
4. Determinación de la relación genética entre las cepas SARM mediante PFGE y MLST

6. METODOLOGÍA

Se e describieron en primera instancia los aspectos generales y posteriormente la metodología por objetivo específico.

6.1 Aspectos generales

6.1.1 Cepas control

El presente estudio se realizó analizando cepas SARM recolectadas y cepas control respecto a los objetivos específicos del estudio. Las cepas control corresponden a las indicadas en tabla 2:

Tabla 2: Cepas control utilizadas en el estudio, relacionada a su objetivo de uso y origen.

Nombre de cepa	Objetivo de uso	Donante-origen	Características
ATCC® BAA1026	Confirmación genética de cepas SARM	Laboratorio Microbiología sede San Felipe	SARM

ATCC® 25923	Objetivo específico 1 (subtítulo 7.1)	Laboratorio Microbiología sede San Felipe	<i>S. aureus</i>
UCO-484: Clon USA300 (NARSA 482)	Objetivos específicos 2 y 3 (subtítulos 7.2 y 7.3)	Laboratorio Universidad de Concepción, Dra. Helia Bello	SARM Clon USA300, SCCmec IV, <i>pvl</i> ⁺
UCO-498	Objetivo específico 2 (subtítulo 7.2)	Laboratorio Universidad de Concepción, Dra. Helia Bello	SARM Clon chileno/cordobés, SCCmec I
UCO-499	Objetivo específico 2 (subtítulo 7.2)	Laboratorio Universidad de Concepción, Dra. Helia Bello	SARM clon new york/japón, SCCmec II
UCO-503	Objetivo específico 2	Laboratorio	SARM clon

28

	(subtítulo 7.2)	Universidad de Concepción, Dra. Helia Bello	húngaro, SCCmec III
--	-----------------	---	------------------------

6.1.2 Recolección de cepas

Se incluyeron 44 cepas previamente identificadas como SARM, aisladas de portación nasal de estudiantes de medicina y enfermería de UV Campus San Felipe (n=2), Hospital San Camilo (n=1), Hospital Dr. Gustavo Fricke (n=17), Hospital Carlos Van Buren (n=9) y del ISP que provinieron de instituciones de salud de la región de Valparaíso (n=15). Durante la recolección de bacterias SARM de laboratorios microbiológicos de hospitales de la región, 8 no presentaron características para ser incluidas en el estudio. Las cepas correspondieron a la región de Valparaíso, Chile, del período 2017-2019.

Las cepas fueron identificadas con un número, resguardando la confidencialidad

del usuario del cual fue aislada. Al no haber acceso a la totalidad de fichas clínicas, se desconoce clasificación SARM-AC o SARM-AH de cada cepa. Las bacterias fueron estudiadas en los laboratorios de investigación de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso en Chile y en el Servicio de Microbiología del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), España.

6.1.3 Criterios de inclusión y exclusión

En el estudio se incluyeron aislamientos de origen humano, se identificaron como SARM usando como marcadores genéticos los genes *spa* y *mecA*, aisladas de personas dentro de la región de Valparaíso en Chile en el período de años 2017-2019.

Los criterios de exclusión utilizados correspondieron a cepas aisladas de especies no humanas, identificadas como SASM, cepas que carecieran de genes *spa* y *mecA*, aislamientos de SARM de humanos que se encontraran fuera de la región de Valparaíso y del período de tiempo descrito.

6.2 Cultivo de cepas

Las cepas de SARM se cultivaron en agar sangre o agar sal-manitol incubadas a 37°C en estufa de cultivo, durante 18 horas (38). Los laboratorios en que se desarrollaran las actividades, desde cultivo a las propuestas por cada objetivo

específico, serán realizadas en laboratorios con nivel de bioseguridad nivel 2 acorde a lo propuesto por el Instituto de Salud Pública de Chile, 2013 (39,40).

29

6.3 Extracción de ADN

Para la aplicación de PCR se realizó extracción de ADN, utilizando colonias bacterianas previamente cultivadas. Se ajustó la concentración bacteriana uniformemente, se resuspendieron las colonias en solución estéril de 0,9% de NaCl, a una densidad óptica de 0,6 A en el espectrofotómetro a 625 nm, 1 ml de la suspensión se centrifugaron a 16.000xg durante 2 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El pellet bacteriano se resuspendió en 1 ml de buffer compuesto por Trizma base 20 mM, NaCl 150 mM a un pH de 7,6 y se le agregó 40 µl de lisozima a una concentración de 10 mg/ml, se incubaron a 39 °C por 90 min, se centrifugaron a 16.000xg durante 2 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se recuperó el pellet bacteriano en 100 µL buffer de lisis compuesto por 10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl y 1% de Tritón. La lisis celular se completó al calentar a 100°C durante 15 minutos, posteriormente los tubos se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, se centrifugaron a 16.000xg por 2 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante con el ADN

bacteriano en tubos eppendorf estériles y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.4 Cuantificación de ADN

La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría midiendo absorbancia a 260 nm (A_{260}), considerando $A_{260}=1$ equivale a 50 ug ADN/ml, se utilizaron cubetas de cuarzo y agua bidestilada estéril, siendo un control de la técnica una cubeta de cuarzo agua bidestilada estéril, con él se calibró el equipo con $A_{260}=0$, en cada cubeta de cuarzo se midió el ADN templado diluido 200 veces, se aplicó la relación previamente mencionada considerando disolución y se calculó para obtener el valor en ng/ul. Se conservó el ADN templado de cada cepa a -20°C hasta su uso.

6.5 Confirmación genética cepas SARM y límite de detección de genes *spa* y *mecA*

Posterior a la extracción de ADN se realizó una PCR multiplex, con los primers de los genes *spa* y *mecA* utilizados por Okolie *et al.* 2015 (18), de los cuales se

obtuvieron amplicones de 101pb (*spa*) y 155 pb (*mecA*), se realizó previamente la estandarización de la técnica con diferentes concentraciones de ADN de cepa control positivo ATCC® BAA1026™, concluyendo en una solución de PCR, compuesta por concentraciones finales de 1X Buffer de reacción ThermoPol, 0,2 mM dNTPS, 0,5 µM de primers forward (*sp-1*, *me-1*) y 0,5 µM primers reverse (*sp-2*, *me-2*), 200 ng de ADN templado, 0,625 U de Taq Polimerasa (New England Biolabs, UK) y agua bidestilada estéril hasta completar 25 µL de volumen. Se ubicaron los tubos de PCR en el termociclador, y la reacción se realizó según programa de tabla 3.

Tabla 3: Programa m-PCR óptimo para detección genes *spa* y *mecA*.

Temperatura	Etapas	Nº de Ciclos	Tiempo por ciclo
94°C	1.Desnaturalización inicial	1 ciclo	5 min
94°C	2.Desnaturalización*	30 ciclos	30 seg
55°C	3.Unión de primers		30 seg
68°C	4.Extensión Polimerasa°		30 seg
68°C	5.Extensión final	1 ciclo	5 min
4°C	6.Conservación	1 ciclo	Infinito

(*) Desde la segunda a la cuarta etapa (°), se repitieron 30 ciclos de forma consecutiva

de un paso tras otro, formando 1 ciclo la finalización de la cuarta etapa, momento en que se repitieron.

La estandarización contempló en primera instancia el comprobar el programa de PCR y definir el límite de detección de ADN, para ello se utilizaron diferentes cantidades de ADN del control positivo cepas ATCC® BAA1026™, 200 ng – 100 ng- 50 ng – 25 ng – 12,5 ng – 6 ng – 3 ng – 1,5 ng – 0,75 ng – 0,35 ng, definiéndose que el nivel mínimo de detección de la técnica fue a 0,75 ng de ADN por mezcla de reacción PCR (resultados se muestran en figura 3b). Se determinó la cantidad de ADN bacteriano mínimo para detectar *spa* y *mecA* según los resultados en cuanto a visualización del tamaño de amplicones esperados comparados con el marcador de peso molecular ADN pb Ladder (New England Biolabs, UK), separados en un gel de agarosa según se describe en electroforesis en gel de agarosa. Acorde a la optimización de la técnica, las reacciones se realizaron a una concentración de 40 ng/ul, para obtener 200 ng de ADN por mezcla de PCR.

31

6.5.1 Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2%, con tinción con bromuro de etidio 0,5 g/L y en buffer TBE 1X, se separaron los productos de PCR a 80 V por 1 hora, finalmente se visualizaron los resultados en transiluminador UV(18). La cepa control positivo *S. aureus* resistente a meticilina ATCC® BAA1026™, ha sido utilizada como control en literatura (41,42) y para el control negativo se reemplazó el ADN genómico por agua bidestilada estéril.

6.6 Metodología por objetivo específico

6.6.1 Objetivo específico 1. Identificación del fenotipo de resistencia antibiótica de las cepas SARM

Se caracterizó la resistencia antibiótica (antibiotipo) por técnica de difusión de discos en agar Mueller-Hinton según “Kirby & Bauer” (41), siguiendo estándar del “Clinical and Laboratory Standards Institute” 2020 (CLSI), utilizando sensidiscos de penicilina G (10 µg), oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), teicoplanina (30 µg), levofloxacin (5 µg), minociclina (30 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (20 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (23,75/1,25 µg), cloranfenicol (30 µg), rifampicina (5 µg),

gentamicina (10 µg) (Oxoid Ltd, UK). Posteriormente se incubaron por 18 horas a 37°C (39). El uso de cefoxitina es debido a que en un mismo cultivo se presenta una heterogeneidad respecto a cepas sensibles y cepas resistentes, en las cuales la cefoxitina induce la expresión del gen *mecA* (39). Como control de la técnica a realizar se utilizaron cepas *S. aureus* ATCC® 25923. Para detección de resistencia inducible a clindamicina en *S. aureus* se utilizó el D-test según Montoya *et al.* 2009 (43).

En caso de la susceptibilidad a vancomicina, se realizó técnica de concentración mínima inhibitoria (CIM) por macrodilución en caldo y para cada cepa en duplicado. Para ello, se cultivaron cada una de las cepas a una concentración de 5×10^5 bacterias/ml, en caldo de cultivo Mueller-Hinton, durante 24 horas a 35 °C y conteniendo diferentes concentraciones de vancomicina: 0 µg/mL, 0,39 µg/mL, 1,56 µg/mL, 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL. Para las pruebas se utilizaron los protocolos y la interpretación según CLSI 2018 (44,45). La variable para analizar fue el espectro de resistencia antibiótica que presentaron

32

las cepas, las cuales fueron tabuladas, posteriormente se les asignó un número según el espectro presentado para su agrupación y análisis.

6.6.2 Objetivo específico 2. Determinación del tipo de cassette cromosomal estafilocócico de resistencia a meticilina de las cepas SARM confirmadas

Para la definición del tipo de SCCmec se utilizaron 4 pares de primers que diferencian entre los tipos I-IV, se basó en los primers y protocolo de PCR multiplex (PCRm) descrito por Boye *et al.* 2007 (46). Cada reacción de PCR se realizó con un volumen total de 25 µl, conteniendo 1X Buffer de reacción ThermoPol (New England Biolabs, UK), 0,2 mM dNTPS, 0,625 U de Taq Polimerasa (New England Biolabs, UK). La concentración de los primers utilizados fue de 0,35 µM de cada primer β (Forward) y α3 (Reverse), 0,6 µM de cada primers *ccrCF* (Forward) y *ccrCR* (Reverse), 0,24 µM de cada primer 1272F1 (Forward) y 1272R1 (Reverse) y 0,3 µM de cada primer 5RmecA y 5R431. Los tubos de PCR con cada solución se llevaron a termociclador, se programaron según lo propuesto en la tabla 4:

Tabla 4: Programa termociclador PCR para tipo de SCCmec

T°	Etapas	N° de Ciclos	Tiempo por ciclo
94°C	1.Desnaturalización inicial	1 ciclo	5 min
94°C	2.Desnaturalización*	35 ciclos	30 seg
55°C	3.Unión de primers		30 seg

68°C	4.Extensión de ADN Polimerasa°		1 min
68°C	5.Extensión final	1 ciclo	5 min
4°C	6.Conservación	1 ciclo	Infinito

(*) Desde la segunda a la cuarta etapa (°), se repitieron 35 ciclos de forma consecutiva de un paso tras otro, formando 1 ciclo la finalización de la cuarta etapa, momento en que se repitieron.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, con tinción con bromuro de etidio a 0,5g/L. La corrida electroforética se realizó a 80 V durante 60 minutos, posteriormente se analizó en transiluminador con UV determinando el tipo de cassette, según tabla 5. Previamente, se realizó la estandarización de la técnica utilizando las cepas control positivo y se utilizó UCO-498 en reacciones rutinarias como control positivo de reacción de PCR (tabla 5). Como control negativo se utilizó la reacción de PCR sin ADN, reemplazado por agua bidestilada estéril.

33

Tabla 5: Cepas control utilizadas para la reacción mPCR y resultados esperados para los diferentes tipos de cassette SCCmec

Cepa Control	SCCmec	Amplicón(es) esperado(s)
UCO-498	I	415 pb
UCO-499	II	937 pb
UCO-503	III	518 pb
UCO-484	IV	937 pb y 415 pb

Finalmente, del presente objetivo se realizaron dos análisis, el primer análisis respecto al tipo de SCCmec que presentaban las cepas, clasificadas acorde a patrón descrito en tabla 5 (clasificando a cada cepa como tipo I, II, III, IV o NT como no tipificable al no haber amplificación de los diferentes SCCmec de la reacción), posteriormente se analizaron los tipos de SCCmec identificados en cada cepa SARM estudiada y se compararon con los perfiles de resistencia antimicrobiana de ellas.

6.6.3 Objetivo específico 3. Detección de la presencia del gen codificante para

el factor de virulencia leucocidina de Panton-Valentine en cepas SARM

Se detectó el gen *pvl* en cada muestra con confirmación genética de genes *spa* y *mecA*. Para ello se utilizó una PCR simple, con protocolos y primers utilizados por Okolie *et al.* 2015, pv-1 y pv-2 (18). Las condiciones de las reacciones de PCR fueron 1X Buffer de reacción ThermoPol (New England Biolabs, UK), 0,2 mM dNTPS, 0,75 µM de cada primers, 200 ng de ADN templado, 0,625 U de Taq Polimerasa (New England Biolabs, UK), en un volumen final de 25 µl completando con agua bidestilada estéril. Posteriormente se ubicaron los tubos de PCR en el termociclador, usando el programa descrito en la tabla 6.

Tabla 6: Programa de PCR para gen *pvl*

Temperatura	Etapas	Nº de Ciclos	Tiempo por ciclo
94°C	1.Desnaturalización inicial	1 ciclo	5 min
94°C	2.Desnaturalización*	35 ciclos	30 seg
58°C	3.Unión de primers		30 seg
68°C	4.Extensión de ADN Polimerasa°		30 seg
68°C	5.Extensión final	1 ciclo	30 seg
4°C	6.Conservación	1 ciclo	Infinito

(*) Desde la segunda a la cuarta etapa (°), se repitieron 35 ciclos de forma consecutiva de un paso tras otro, formando 1 ciclo la finalización de la cuarta etapa,

34

momento en que se repitieron.

Previo a la aplicación de la técnica se realizó una estandarización de ella, mediante gradiente de temperatura desde los 46°C a 60°C, basado en lo utilizado por Okolie *et al.* 2015.

El análisis de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con tinción con bromuro de etidio a 0,5g/L y buffer TBE 1X, la corrida se hizo durante 60 min a 80 V, se analizó la presencia del gen *pvl* con un tamaño esperado de 118 pb, comparando su tamaño con el ADN 100 pb Ladder (New England Biolabs, UK) en transiluminador UV. Como control positivo se utilizaron cepas *pvl* positiva SARM UCO 484, como control negativo se usó la solución maestra sin templado de ADN, se le agregó agua bidestilada estéril.

En el presente objetivo específico se realizaron dos análisis. El primero fue

respecto a la presencia o ausencia del amplicón de 118 pb, definiendo a cepas como positivas o negativas al gen *pvl*. El segundo análisis fue en relación al tipo de *SCCmec* que presentaban las cepas, definiéndolas como "*SCCmec* X – *pvl*⁺ / *SCCmec* X – *pvl*⁻", siendo la X en este caso el tipo de cassette *SCCmec*.

6.6.4 Objetivo específico 4. Determinación de la relación genética entre las cepas SARM mediante PFGE y MLST

Se analizó la variabilidad genética entre las cepas bacterianas mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y secuenciación tipo multilocus (MLST).

6.6.4.1 Protocolo PFGE

El protocolo utilizado en electroforesis del gel en campo pulsado están basados en los utilizados por Murchans *et al.* 2003 (47) y Delgado *et al.* 2011 (48), para ello se cultivaron cepas SARM, una cantidad constante de bacterias se homogeneizaron con agarosa al 1% fundida, se armaron bloques de 1 mm de ancho y se dejaron enfriar, se lisaron las bacterias mediante solución de lisis conteniendo Tris 6mM, NaCl 1M, Brij-58 0,5%, EDTA 100 mM, Deoxicolato 0,2%, sarcosyl 0,5%, ADNasa 10 µg/ml, lisostafina 1mg/ml, se incubó a 37°C por 16 horas. Se eliminó la solución de lisis y se añadió solución de digestión compuesta por EDTA 0,5 mM, sarcosyl 1% y proteinasa K (inicial 20 mg/ml), se incubó a 56°C por 16 horas. Terminada la digestión, se realizaron 2

35
lavados con agua destilada de 10 minutos con agitación a 50°C y 4 lavados con buffer TE (Tris 1mM pH 8-EDTA 0,5 mM pH 8) de 15 minutos a 50°C cada uno, finalmente se conservaron en 1 ml de TE a 4°C hasta su uso. Se cortó 1/3 de cada bloque y se digirieron en un buffer de digestión compuesto por 1X *SmaI* buffer (Takara), BSA 0,001%, 10 U de enzima *SmaI* (Takara), agua destilada estéril y se incubaron a 37°C durante 16 horas (47,48). Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1,2% con buffer TBE 0,5X, se posiciono el gel en la cámara de electroforesis CHEF DR-II System (Bio-Rad Laboratories, Hércules) y se separaron los fragmentos de ADN durante 23 horas a 6V/cm², divididos en 2 bloques, un primer bloque de 10 horas con tiempo inicial de 5s y final de 15s y un segundo bloque de 13 horas con tiempo inicial de 15s y final de 60s, junto a los fragmentos de ADN se cargaron los marcadores de peso molecular CHEF DNA Size Standard, Lambda Ladder (Bio-Rad Laboratories) (48). Finalizada la electroforesis, se retiró el gel de agarosa y se realizó tinción con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 10 minutos, se eliminó el exceso lavando durante 3 minutos en agua destilada. Finalmente, se observaron los resultados en transiluminador UV y se imprimió foto. Los perfiles de PFGE se analizaron con programa BioNumerics®,

perteneciente a Applied Maths y se estableció el corte para el agrupamiento de las cepas en un valor de coeficiente de similitud de 0,7.

6.6.4.2 Protocolo MLST

La técnica de MLST se realizó a 19 de las cepas SARM, representativas de diferentes grupos de obtenidos desde el análisis de PFGE. 2 cepas estaban previamente caracterizadas por MLST (2 y 3). Para ello se amplificaron y luego secuenciaron los amplicones de 7 genes *housekeeping* de *S. aureus* *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmK*, *pta*, *tpi* e *ygi*, para ello se realizó una PCR con los primers y protocolos descritos en <https://pubmlst.org>, la reacción de PCR se realizó utilizando una temperatura de hibridación de 55°C. Luego se verificó la amplificación de los genes por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se purificaron las reacciones de PCR aplicando a cada tubo ExoSAP-IT, Illustra, ExoProStar 1-step según describe el fabricante (GE Healthcare, Life Science, UK). Posteriormente se enviaron a secuenciar con MacroGen, España.

El análisis bioinformático se realizó utilizando el programa Chromas, Technelysium, se corrigió la secuencia de cada gen, se ingresaron las secuencias de cada alelo en <https://pubmlst.org>, determinando un alelo acorde a su algoritmo,

36

posteriormente dentro del sitio web se ingresó el perfil de alélico de cada cepa, en donde se asignó el secuenciotipo correspondiente junto a su complejo clonal. El presente objetivo específico se analizó por diferentes variables, siendo la primera por PFGE el análisis de relación genética de las cepas con un coeficiente de similitud con corte en 0,7 y acorde a lo indicado por Tenover *et al.* 1995 (49) se definieron grupos clonales como pulsotipos "PT" y se enumeraron. Se analizaron los secuenciotipos con su correspondiente complejo clonal acorde a lo indicado por página <https://pubmlst.org>, las cepas aisladas que conformaban dichos grupos clonales acorde al año de aislamiento, tipo de SCCmec, resistencia antimicrobiana y lugar físico de aislamiento. Finalmente se integraron las variables analizadas en el proyecto en objetivos específicos 2, 3 y 4, agregando a las cepas las características determinadas resultando perfiles definidos como "ST SCCmec -*pvl*^{+/−}", siendo "ST" el secuenciotipo, "SCCmec" el tipo de cassette cromosomal estafilocócico y "*pvl*^{+/−}" indicando el perfil de cepas con las características previas siendo positivas (+) o negativas (−) al gen *pvl*.

6.7 Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva de frecuencias, aplicando límite de confianza de 95% al realizar análisis de la totalidad de cepas incluidas en el estudio (n=44). Para la

realización de los análisis, se utilizó el programa Mypstat. Para análisis del objetivo específico 2, se analizó el SCCmec en relación con *pvl* se usará test de Fisher con valor $p=0,05$.

6.8 Proyecto

El proyecto se enmarca en el proyecto CONICYT Folio: MEC 80180065, con el título "Actualización y fortalecimiento de la investigación en microbiología con énfasis en el microbioma y en las bacterias patógenas" de la Dra. Carmen Aravena, con la colaboración de la Dra. Rosa del Campo y Dra. Jenny Llanos.

El presente estudio no requirió aprobación de comité de ética para su realización, sin embargo, fue evaluado por el comité de ética del Hospital Dr. Gustavo Frické, quienes eximieron al proyecto de su necesidad (Anexo A).

37

7. Resultados

7.1 Objetivo específico 1. Identificación del fenotipo de resistencia antibiótica de las cepas SARM

Al realizar el análisis de fenotipos de resistencia, se obtuvieron 12 perfiles diferentes, los tres espectros más comunes correspondieron a cepas monorresistentes (antibiotipo I), frente a familia de β -lactámicos, un segundo grupo con cepas multirresistentes a β -lactámicos junto a macrólidos, lincosamidas, quinolonas y aminoglucósidos (antibiotipo XI) y un tercero con resistencia a β -lactámicos, lincosamidas, macrólidos y quinolonas, componiendo entre los 3 el 79,6% de la muestra analizada (tabla 7). A pesar de que dichos perfiles fueron los más comunes, existió en general una amplia variedad de fenotipos de resistencia a diferentes familias. El análisis por antimicrobiano independiente, se obtuvo que un 95,5% de cepas SARM fueron resistentes a oxacilina, un 72,7% de cepas fue resistente a eritromicina, un 56,8% presentaron resistencia a clindamicina, a su vez un 9,1% resistencia inducible a clindamicina. Respecto a quinolonas, se presentó una resistencia a levofloxacino en un 59,1% y un 4,5% mostró resistencia intermedia, a gentamicina hubo un 36,4% de cepas SARM resistentes (tabla 7). Por otra parte, existieron antibióticos en donde hubo resistencia en menor frecuencia las rifamicinas (representante la rifampicina), con un 2,3% de cepas resistentes a ellas. Se identificaron 2 cepas SARM sensibles a oxacilina (OS-SARM), con resistencia a

macrólidos y a clindamicina de manera inducible (tabla 7, figura 4A). Las cepas del estudio fueron todas sensibles a cotrimoxazol y minociclina.

Es importante mencionar, en relación con los intervalos de confianza de los resultados, en los perfiles con mayor frecuencia se observan valores de confianza mayores, siendo las cepas con perfiles I y XI con valores de IC_{95%} de 9,8%-48,4% de la muestra, las con perfil IX poseen un IC_{95%} de 8,4%- 45,9%. Por otra parte, los perfiles caracterizados por obtener una frecuencia del 2,3% de cepas, se caracterizaron por poseer IC_{95%} de 0%-16,3% (tabla 7). Los valores de intervalo de confianza del estudio poseyeron una variabilidad alta en cuanto al perfil de resistencia antimicrobiana.

Dentro de las resistencias del antibiotipo IX se observaron 9 cepas con resistencia a los antimicrobianos de dicho perfil, y una cepa con resistencia intermedia a levofloxacino (cepa 19) y una segunda una cepa con resistencia inducible a clindamicina junto a resistencia intermedia a levofloxacino (cepa 11)

38

Tabla 7: Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas SARM (n=44).

Antibiotipo	Perfil de resistencia	N° de antibióticos resistentes	F	%	IC_{95%}
I	PEN-OXA-FOX	1	12	27,3%	9,8%-48,4%
II	PEN-OXA-FOX-ERI	2	1	2,3%	0,0%-16,3%
III	PEN-OXA-DA ^{ind} -ERI	3	1	2,3%	0,0%-16,3%
IV	PEN-OXA-FOX-ERI-LEV	3	1	2,3%	0,0%-16,3%
V	PEN-OXA-FOX-DA-LEV	3	1	2,3%	0,0%-16,3%
VI	PEN-FOX-DA ^{ind} -ERI-LEV	4	1	2,3%	0,0%-16,3%
VII	PEN-FOX-DA ^{ind} -ERI-G	4	1	2,3%	0,0%-16,3%
VIII	PEN-OXA-FOX-ERI-LEV-G	4	1	2,3%	0,0%-16,3%

IX	PEN-OXA-FOX-DA ^{ind} -ERI-LEV*	4	11	25,0%	8,4%- 45,9%
X	PEN-OXA-FOX-DA-ERI-G-RD	5	1	2,3%	0,0%- 16,3%
XI	PEN-OXA-FOX-DA-ERI-LEV-G	5	12	27,3%	9,8%- 48,4%
XII	PEN-OXA-FOX-DA ^{ind} -ERI-LEV-CN	5	1	2,3%	0,0%- 16,3%

Cada número romano es un antibiotipo. F: Frecuencia de cepas con el antibiotipo. %: Porcentaje de cepas con dicho antibiotipo. pen: penicilina fox: cefoxitina; oxa: oxacilina; da: clindamicina; eri: eritromicina; lev: levofloxacino; g: gentamicina; rd: rifampicina; cn: cloranfenicol

^{ind}Referido antibiotipos donde se incluyó cepas con resistencia inducible a clindamicina

39

*Referido a antibiotipos similares donde se presentan tanto cepas con resistencia como con resistencia intermedia

Se aplicó método de CIM por macrodilución en tubos a la totalidad de cepas SARM para confirmación de sensibilidad a vancomicina, finalmente se determinó que las cepas fueron sensibles, específicamente se presentó una cepa con resultado de resistencia en método de difusión con sensidisco en agar, sin embargo, al realizar CIM se inhibió el crecimiento a una concentración de vancomicina de 1,56 ug/mL (figura 4B), siendo sensible al antibiótico.

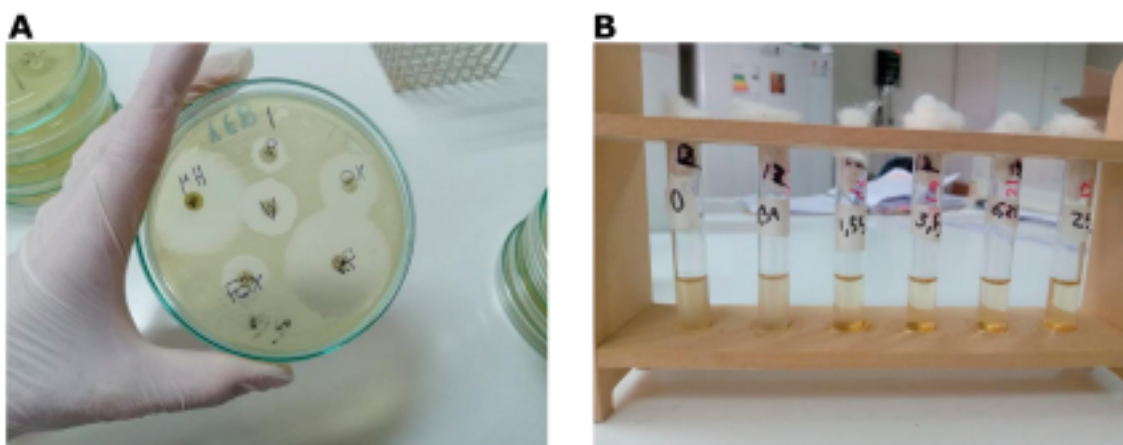


Figura 4: Susceptibilidad antimicrobiana

A: Resultado de antibiograma por difusión en disco de agar de cepa OS-SARM

7.2 Objetivo específico 2. Determinación del tipo de cassette cromosomal estafilocócico de resistencia a meticilina de las cepas SARM confirmadas

Tipo de SCCmec

Los tipos de cassette *SCCmec* identificados por mPCR en las cepas SARM estudiadas fueron tipo I con un amplicón de 415 pb, tipo II con un amplicón de 937pb y tipo IV con dos amplicones de 937 pb más 415 pb respectivamente (figura 5 y tabla 8), las bacterias con *SCCmec* tipo I fueron las más frecuentes con una proporción de un 33,9%-72,3% (IC_{95%}), las *SCCmec* tipo IV con un porcentaje entre 11,7% a 46,0% (IC_{95%}) siendo ambas altamente variables (tabla 8). No se diferenció entre subtipos de *SCCmec* IV. El *SCCmec* menos común entre las cepas recolectadas en este estudio fue el tipo II (937 pb) con una frecuencia variable entre un 1,2%-24,6% (IC_{95%}) (tabla 8). No se identificaron en las cepas de este estudio el *SCCmec* tipo III ni V. En figura 5 se observa imagen demostrativa de PCR multiplex de genes de *SCCmec*, siendo la columna 4 resultado *SCCmec* tipo I (con amplicón de 415 pb), la columna 6 *SCCmec* tipo IV (con amplicones de 937 pb y 415 pb) y en la columna 12 se identificó un resultado para *SCCmec* tipo II (con amplicón de 937 pb) (figura 5).

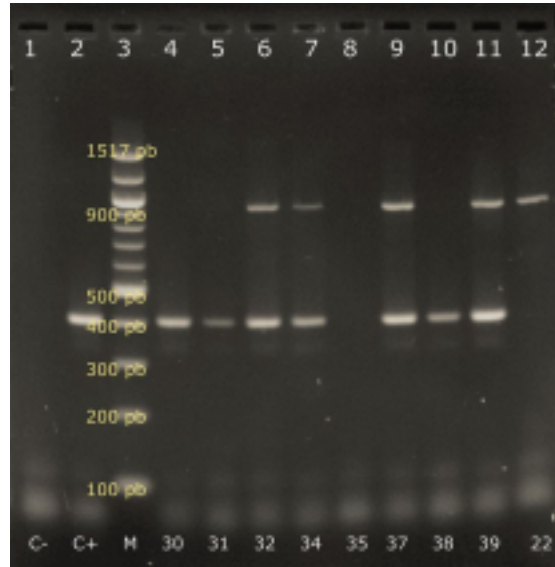


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa mPCR para tipo de cassette *SCCmec* en cepas SARM. Cada carril corresponde a lo indicado en zona inferior de imagen, se observan C-: control negativo, C+: control positivo, M: marcador de peso molecular y

carriles 4 a 12 resultados de PCR usando como templado ADN de cepas SARM estudiadas. Cepa 35 fue repetida con posterioridad, cepas 38 y 22 fueron eliminadas del estudio.

Tabla 8: Tipos y frecuencias de *SCCmec* identificados en cepas SARM (n=44)

Tipo de <i>SCCmec</i>	Frecuencia	Porcentaje	IC _{95%}
I	24	54,6%	33,9%-72,3%
II	4	9,1%	1,2%-24,6%
IV	12	27,3%	11,7%-46,0%
NT	4	9,1%	1,2%-24,6%

Se asignaron los diferentes tipos de cassette *SCCmec* mediante números romanos. NT es referido a cepas que no reaccionaron con primers utilizados, quedando sin tipificación de *SCCmec*.

De las cepas SARM que presentaron el *SCCmec* tipo I (24/44), es donde hubo una mayor heterogeneidad en los antibiótipos respecto a cepas que tienen otro *SCCmec*, observando en el gráfico de figura 6 que el 41,7% de dichas cepas (10/24) poseen antibiótipo del XI (siendo el perfil de resistencia antibiótica más común en dicho cassette), un 29,2% (7/24) poseen antibiótipo IX, un 12,5% (3/24) fueron resistentes

solo a β -lactámicos (antibiotipo I), posteriormente el 16,8% (4/24) restante de cepas presentaron antibiotipos III, V, X y XII (cada uno con una cepa) fueron resistentes una a β -lactámicos, clindamicina y eritromicina (antibiotipo III), la segunda a β -lactámicos, clindamicina, levofloxacino (antibiotipo V) y la tercera fue resistente a β -lactámicos, clindamicina, eritromicina, gentamicina y rifampicina (antibiotipo X) y la última se observó resistencia a β -lactámicos, clindamicina, levofloxacino, y cloranfenicol (antibiotipo XII) (figura 6).

Por otra parte, las cepas SARM que poseyeron el SCCmec tipo IV (12/44), mostraron mayoritariamente el antibiotipo del I (figura 6), con resistencia al grupo de β -lactámicos y el restante de cepas mostraron resistencia a mayor cantidad de antibióticos (2, 3 y 4 respectivamente) (tabla 7). Finalmente, cuatro cepas SARM tuvieron el SCCmec tipo II, 3 cepas con antibiotipo IX y 1 cepa con antibiotipo VI, todas ellas fueron multirresistentes y comparten la resistencia a clindamicina, eritromicina y levofloxacino. Finalmente, se presentan 4 cepas que no fueron tipificadas con la técnica disponible y mostraron resistencia a 4 o más tipos de antibióticos (figura 6).

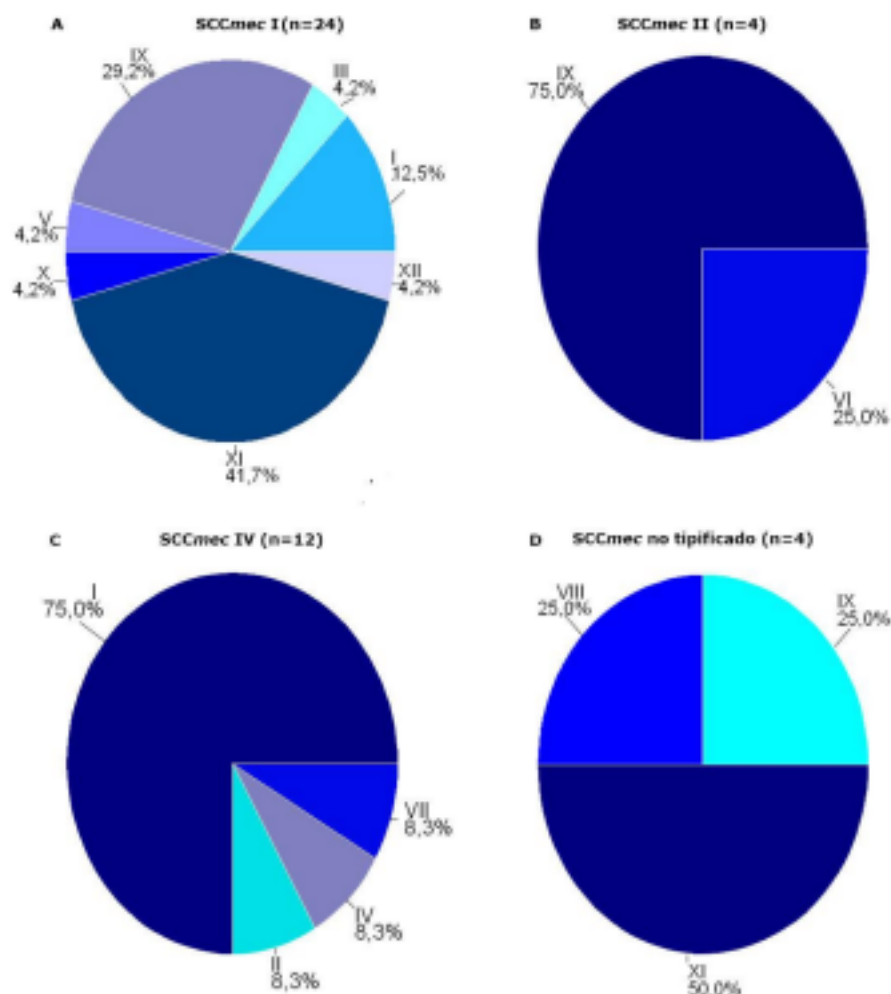


Figura 6: Distribución de los antibiotipos según tipo de SCCmec en cepas SARM. Comparación de diferentes perfiles de antibiotipo integrados en relación con los tipos de SCCmec detectados y expresado en porcentajes. Gráfico A corresponde a los perfiles de antibiotipos de cepas con SCCmec I; gráfico B SCCmec II análisis de perfiles de antibiotipo de cepas con SCCmec II; gráfico C SCCmec IV análisis de perfiles de antibiotipo de cepas con SCCmec IV; gráfico D SCCmec no tipificado análisis de perfiles de antibiotipo de cepas con SCCmec IV sin tipificación de SCCmec.

7.3 Objetivo específico 3. Detección de la presencia del gen codificante para el factor de virulencia leucocidina de Pantón-Valentine en cepas SARM

Un 84,1% de cepas SARM (37/44) resultaron positivas al gen *pvl* detectado por la presencia del amplicón de 118 pb (figura 7). El IC_{95%} *pvl* fue entre un 66,7%-93,8% (tabla 9).

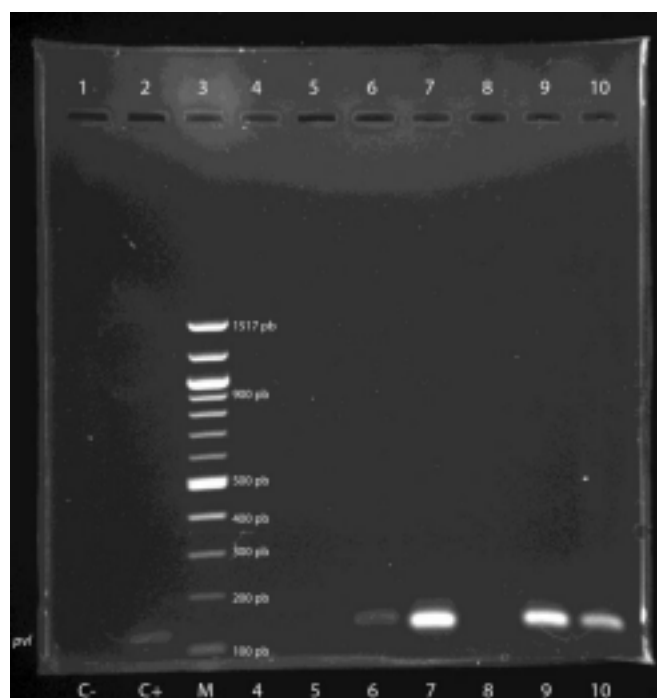


Figura 7: Imagen de resultado gen *pvl*. Imagen demostrativa de un gel con el resultado de PCR de punto final con el gen *pvl*.

Tabla 9: Prevalencia del gen *pvl* en cepas SARM (n=44)

<i>pvl</i>	Frecuencia	Porcentaje	IC _{95%}
Negativas	7	15,9%	5,3%-66,7%
Positivas	37	84,1%	31,6%-93,8%

Con relación a los tipos de *SCCmec* y *pvl*, se presentó una distribución heterogénea entre cepas *pvl* positivas y los tipos de *SCCmec*, siendo las cepas *SCCmec* tipo I un 79,2% (19/24) positivas al factor de virulencia estudiado, de tipo II un 75% (3/4), tipo IV un 100% (12/12) positivas a *pvl* y las no tipificables un 75% (3/4)

positivas al gen *pvl*. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la proporción del gen *pvl* en relación con los tipos de *SCCmec*, realizando comparaciones entre *pvl* en *SCCmec* tipo I con tipo II ($p=0,6$), *SCCmec* tipo I con tipo IV ($p=1$) y *SCCmec* tipo II con tipo IV ($p=0,3$).

7.4 Objetivo específico 4. Determinación de la relación genética entre las cepas SARM mediante PFGE y MLST

Las cepas estudiadas fueron genéticamente diversas, discriminando un total de 19 pulsotipos (PTs) por PFGE (figura 8), los cuales pertenecieron a siete STs diferentes ST1, ST5, ST8, ST30, ST105, ST225 y uno no descrito anteriormente, a su vez, estos se correspondieron a cinco complejos clonales, específicamente los CC1 (ST1), CC5 (ST5), CC8 (ST8) y CC30 (ST30) (figura 8). De los PTs 9 fueron mayoritarios, compuestos por

dos o más cepas, estos se asignaron como PT1 (2 cepas), PT5 (4 cepas), PT7 (2 cepas), PT9 (2 cepas), PT12 (2 cepas), PT16 (10 cepas), PT18 (3 cepas), PT19 (2 cepas), PT20 (7 cepas) y correspondieron al 61,4% de las cepas SARM estudiadas, el resto 38,6% correspondieron a 10 PTs compuestos por un clon (PT2, PT3, PT4, PT6, PT8, PT10, PT11, PT13, PT14, PT15) (figura 8). El análisis por MLST se realizó en PTs compuestos por una cepa y en PTs compuestos por dos o más se seleccionaron cepas representativas: PT5 (cepa 8), PT7 (cepa 13), PT9 (cepa 18), PT18 (cepa 40), PT19 (cepa 44), PT20 (cepa 45) pertenecieron al secuenciotipo 5 (ST 5) siendo en total 20 cepas; pulsotipos PT12 (cepa 28), PT16 (cepa 33) fueron ST 8 con un total de 11 cepas, a ello se suma una excepción dentro del PT16, la cepa 35 que posee un ST no descrito previamente, finalmente PT1 (cepa 1) fue del ST225 representando a 2 cepas. Otros STs fueron identificados en pulsotipos que representaban cepas sin relación genética o no relacionada, los secuenciotipos ST1 (cepa 27), ST30 (cepa) y ST105 (2 cepas sin relación, cepas 6 y 29) (figura 8).

Respecto a las características genéticas y al año de aislamiento, de 10 cepas del año 2017 mostraron variabilidad genotípica, pues correspondieron a 9 genotipos diferentes: PT2 (ST5 I *pvl*⁻), PT3 (ST5 II *pvl*⁺), PT10 (ST30 IV *pvl*⁺), PT11 (ST1 *pvl*⁻), PT12 (ST8 I *pvl*⁺), PT13 (ST105 *pvl*⁺), PT14 (ST8 I *pvl*⁺), PT15 (ST5 I *pvl*⁺) PT16 (ST8 IV *pvl*⁺), dentro de ellas solo 2 cepas (24 y 26) tuvieron relación genética (PT16) (figura 8), fueron aisladas en diferentes centros asistenciales de dos ciudades contiguas (Viña del Mar y Valparaíso); el resto de cepas de dicho año no tuvieron relación entre las analizadas del mismo período, sin embargo, si con otros años (figura 8).

46

Las cuatro cepas SARM del año 2018 se aislaron en diferentes centros asistenciales y se distinguieron dos grupos clonales, uno de ellos compuesto por 1 cepa, correspondiendo a PT1 (ST225 II *pvl*⁺) y PT16 (ST8 IV *pvl*⁺) el cual se compuso por dos o más clones) (figura 8).

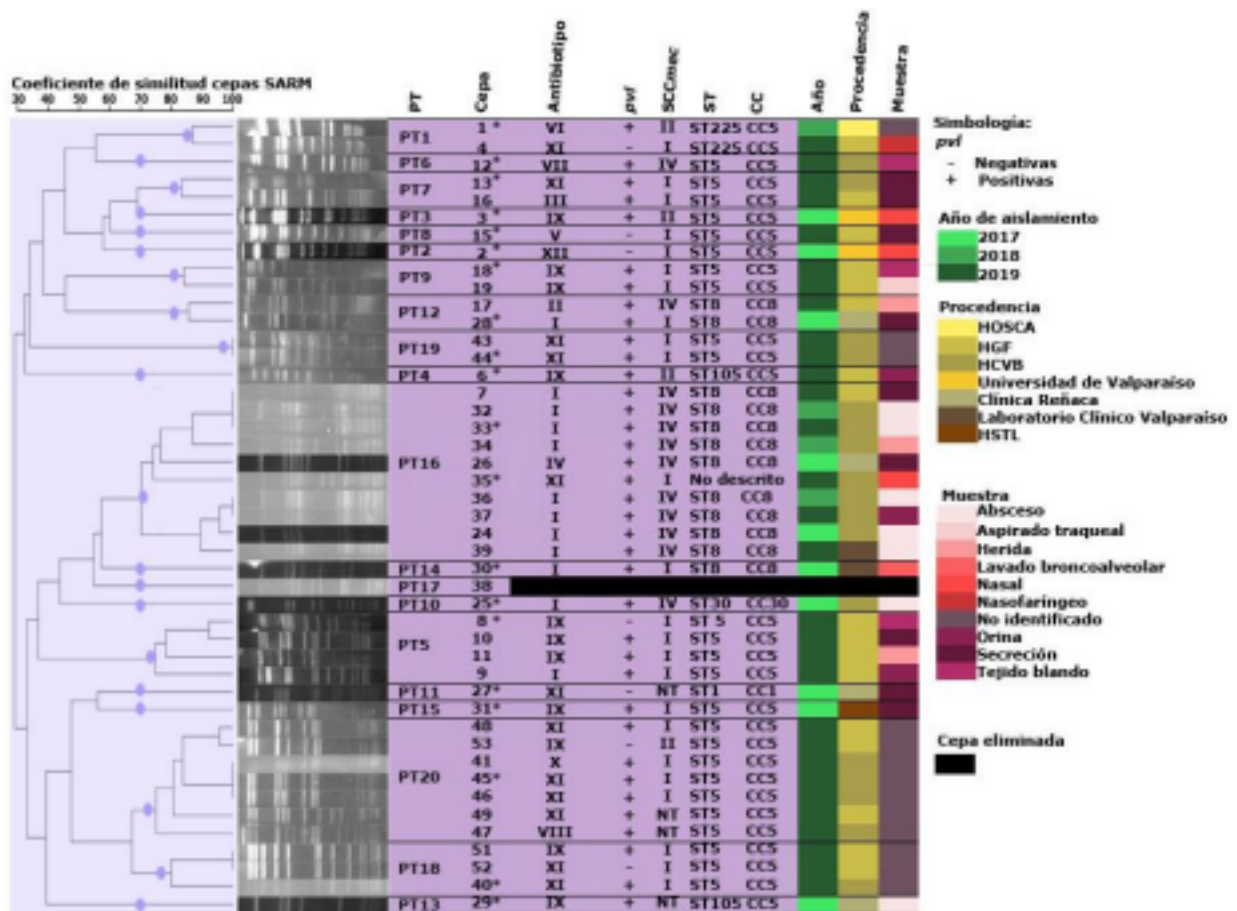


Figura 8: Dendrograma de PFGE y características genotípicas, fenotípicas y demográficas de cepas SARM (n=44). Cada columna es una característica de las cepas estudiadas y cada fila corresponde a todas las características de una cepa SARM. Se agruparon grupos clonales (pulsotipos) utilizando como corte un coeficiente de similitud igual a 0,7. Características por columna se indica el pulsotipo (PT) asignados a cada cepa SARM acorde al PFGE, cepa el número que identifica a cada cepa SARM, identificándose con * las cepas secuenciadas en MLST, antibiograma asignado el perfil de resistencia antimicrobiana, la presencia (positivo) o ausencia (negativo) del gen *pvl*, tipo de SCCmec. El secuenciotipo (ST), el complejo clonal a los cuales pertenecieron

las cepas, el año de aislamiento, la procedencia por institución y la muestra de donde fueron aisladas las cepas. Abreviaturas, NT: Característica no fue tipificable con método utilizado por no amplificación con primers, HOSCA: "Hospital San Camilo", HGF: "Hospital Dr. Gustavo Fricke, HCVB: "Hospital Carlos Van Buren", HSTL: "Hospital Santo Tomás de Limache". Cepa en color negro señala a cepa que fue eliminada del estudio por no cumplir con criterios de inclusión.

En relación con el año 2019 se concentraron la mayor cantidad de cepas

analizadas (n=30), perteneciendo a 12 pulsotipos: PT1 (ST225 I *pvl*⁻), PT4 (ST105 II *pvl*⁺), PT5 (1 cepa ST5 I *pvl*⁻ y 3 cepas ST5 I *pvl*⁺), PT6 (ST5 IV *pvl*⁺), PT7 (ST5 I *pvl*⁺), PT8 (ST5 I *pvl*⁻), PT9 (ST5 I *pvl*⁺), PT12 (ST8 IV *pvl*⁺), PT16 (cuatro cepas ST8 IV *pvl*⁺ y una ST^{NI} I *pvl*⁺), PT18 (dos cepas ST5 I *pvl*⁺ y una ST5 I *pvl*⁺), PT19 (ST5 I *pvl*⁺) y PT20-ST5 (cuatro cepas ST5 I *pvl*⁺, dos cepas ST5 *pvl*⁺ y una cepa ST5 II *pvl*⁻) (figura 8); dichas cepas se agruparon en los pulsotipos PT5, PT9, PT16, PT18, PT19, PT20 con cepas del mismo año y a su vez en forma transversal con cepas de años previos y de diferentes instituciones de salud en la región de Valparaíso. Por ejemplo, el PT1 incluyó dos clones, uno aislado el 2017 en el Hospital San Camilo y una segunda cepa del año 2019 aislada en el Hospital Gustavo Fricke (figura 8), igualmente el PT12 conformado por una cepa aislada en Clínica Reñaca el año 2017 y otra cepa aislada en el Hospital Gustavo Fricke el 2019 (figura 8). También el PT16 (10 cepas) con dos cepas aisladas el 2017 en Hospital Carlos Van Buren y Clínica Reñaca, 2018 con 3 bacterias aisladas en Hospital Carlos Van Buren y 2019 con clones determinados por PFGE aislados en Hospital Gustavo Fricke, Hospital Carlos Van Buren y laboratorio clínico de Valparaíso, de ellas ocho provienen de abscesos, heridas, secreción y orina (poseyendo el SCCmec IV y antibiotipo I) (figura 8). De las cepas aisladas en el Hospital Gustavo Fricke se distinguieron un total de 9 pulsotipos, mientras las correspondientes al Hospital Van Buren se determinaron 8 pulsotipos en los diferentes años en ambos hospitales, sumado a ello, entre ambos centros se observó relación genética en diferentes pulsotipos (figura 8).

En relación con el análisis respecto a los complejos clonales, el CC5 representó al 65,9% (29/44 cepas) (IC_{95%} 44,0%-81,9%), incluyendo a cepas provenientes de diferentes años, el 51,7% (15/29) provino del Hospital Dr. Gustavo Fricke año 2019, el 31,0 % (9/29) del Hospital Carlos Van Buren en el año 2019, el 17,2% (5/29) fueron cepas que no tuvieron relación en su perfil de PFGE y provinieron de diferentes lugares físicos y años (2017 y 2018) (figura 8). Las cepas que correspondieron al CC5 mostraron el ST5, que fueron un 56,8% (25/44) de la totalidad de cepas del estudio, seguido de los ST105 y ST225 con un 4,5% cada uno (2 cepas cada uno).

El segundo complejo clonal con mayor presencia fue el CC8 con un 27,3% (11/44 cepas) (IC₉₅ 11,2%-46,5%) de las cepas SARM estudiadas, el cual fue transversal detectándose en cepas de todos los años, un 54,5% (6/11) correspondieron a cepas aisladas en HCVB en los tres años y están incluidas en un mismo perfil PFGE, correspondiendo al PT16 (figura 8). El siguiente 45,5% (5/11) correspondieron a cepas aisladas en Hospital Dr. Gustavo Fricke, Laboratorio Clínico Valparaíso y Clínica Reñaca, dentro de este grupo clonal se incluyeron cepas aisladas en la Clínica Reñaca año 2017 y Hospital Dr. Gustavo Fricke del año 2019. CC1 fue una cepa aislada el año 2017 en

Clínica Reñaca (figura 8). El CC30 correspondió a una cepa aislada el año 2017 en Hospital Carlos Van Buren (figura 8). Finalmente, una cepa que no ha sido descrita previamente en MLST, siendo el 2,3% (1/44) de la muestra, aislada el 2019 en el Hospital Carlos Van Buren (figura 8).

En relación con los orígenes biológicos de aislamiento, de las 44 cepas 12 no se obtuvo información precisa, de las 32 cepas SARM restante se identifican 14 clasificaciones diferentes, de ellas en el PT7 se relacionan dos provenientes de expectoraciones (cepas 13 y 16), en las cepas del PT16 se aislaron en cuatro orígenes biológicos diferentes los cuales son secreciones (cepas 7, 26, 35), abscesos (cepas 24, 32, 33, 36 y 39), herida (cepa 34) y orina (cepa 37) (figura 8).

En relación con las cohortes según pulsotipo, estos en su mayoría fueron integrados por cepas SARM con diferentes antibiotipos, a pesar de ello, se presentaron pulsotipos que se asociaron a ciertos perfiles de resistencia antibiótica el PT5 incluyó un 75% (3/4) de cepas con antibiotipo IX, PT16 con un 80,0% (8/10) de cepas con resistencia a antibióticos β -lactámicos, antibiotipo I, el PT18 con un 66,7% (2/3) con el fenotipo de resistencia tipo XI, finalmente, en el caso del PT20 un 57,1% (4/7) de cepas presentaron el perfil de resistencia de antibiotipo XI (figura 9). El restante de pulsotipos únicos según PFGE correspondieron a cepas individuales o grupos donde existió heterogeneidad respecto al SCCmec y su antibiotipo (figura 9).

Combinando las características analizadas, el PT16 fue compuesto por el 22,7% (10/44) de cepas SARM estudiadas, caracterizándose como cepas SARM-ST8-IV-*pvl*⁺

49

(figura 8), como previamente se mencionó, se determinaron como resistentes a β lactámicos y solo dos de ellas a levofloxacino, estas fueron cepas aisladas en los años 2017 (n=2/10), 2018 (3/10) y 2019 (4/10) en diferentes centros de salud (figura 8). El segundo grupo mayoritario fue el PT20, compuesto por 15,9% de cepas (7/44), dentro del grupo, cuatro de siete cepas correspondieron a SARM-ST5-I-*pvl*⁺, una SARM-ST5-II-*pvl*⁻ (figura 8) y otras dos cepas de este PT no se logró tipificar su SCCmec pero mostraron un genotipo SARM-ST5-*pvl*⁺, las cepas del PT20 correspondieron al año 2019, aisladas en diferentes centros asistenciales en las ciudades de Viña del Mar y Valparaíso (figura 8), con multirresistencia a oxacilina, cefoxitina, clindamicina, eritromicina, levofloxacino y gentamicina (figura 8).

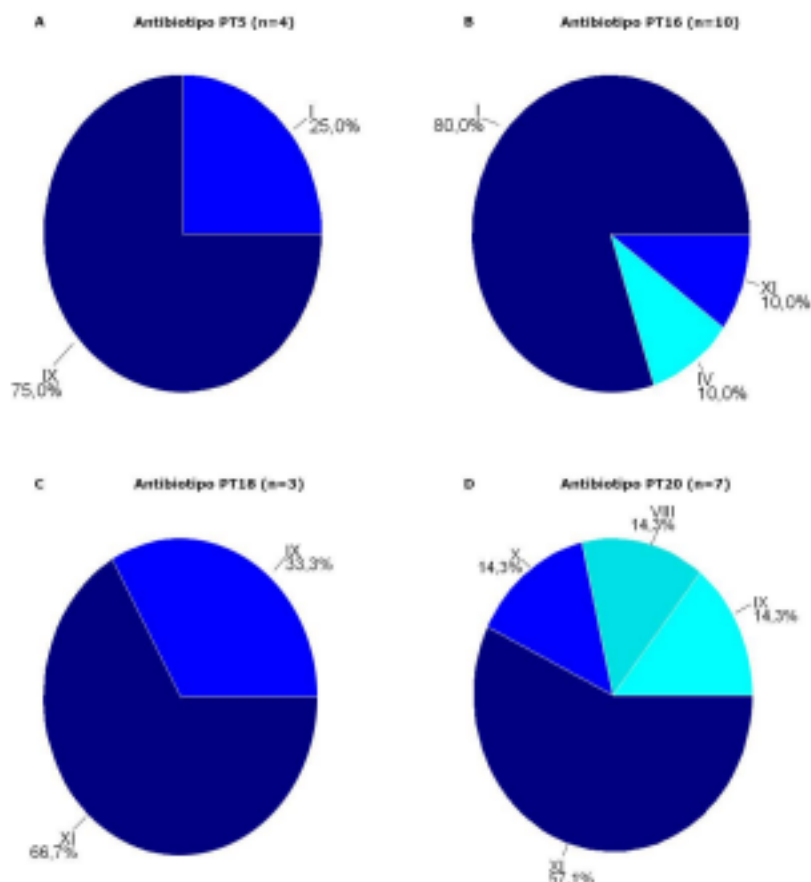


Figura 9: Distribución de los antibiotipos de resistencia antibiótica en los pulsotipos mayoritarios (PT5, PT16, PT18 y PT20) de cepas SARM. A: PT5, B: PT16, C: PT18, D: PT20.

50

En relación con la caracterización genética de SARM según variables de ST, *SCCmec*, y presencia o ausencia del gen *pvl*, se determinaron cepas ST5 I *pvl*⁺, componiendo en forma mayoritaria en la muestra (tabla 10), estas cepas provinieron de instituciones de Limache (año 2017), Viña del Mar y Valparaíso (2019) (figura 8), constituyéndose por cepas provenientes de siete pulsotipos diferentes los PT5, PT7, PT9, PT18, PT19, PT20 compuestos por dos o más cepas y el PT15 único (figura 8). Seguido de este genotipo y mayoritariamente se observaron cepas ST8 IV *pvl*⁺ (tabla 10), compuesto por cepas aisladas en Viña del Mar (2017 y 2019), Valparaíso (2017, 2018 y 2019) (figura 8), que pertenecieron al pulsotipo mayoritario PT16 y a PT12 que representa a una cepa (figura 8). El genotipo ST5 I *pvl*⁻, con 4 cepas SARM, aisladas en Valparaíso (2017) y Viña del Mar (2019), no tuvieron relación genética entre ellas por PFGE perteneciendo a diferentes pulsotipos PT2, PT5, PT8 y PT18 (figura 8) y excepcionalmente la cepa 8 del PT5 común, fue la única de su grupo negativa al gen

pvl. Entre los genotipos obtenidos dos cepas SARM fueron del ST8 I *pvl*⁺ (tabla 10) provenientes de centros de salud de Viña del Mar y Valparaíso ambas del año 2017 pertenecientes a los PT12 y PT14 sin relación genética entre ellos, pero cercanos en el dendrograma al PT16 donde las cepas tienen el mismo secuenciotipo, cassette *SCCmec* pero no poseen el gen *pvl* (figura 8). Los genotipos ST5 II *pvl*⁺, ST5 II *pvl*⁻, ST5 IV *pvl*⁺, ST30 IV *pvl*⁺, ST105 II *pvl*⁺, ST225 II *pvl*⁺, ST225 I *pvl*⁻, se caracterizaron por representar cada uno a una bacteria SARM del estudio (tabla 10). Finalmente, cuatro cepas *SCCmec* no tipificables en su *SCCmec*, entre ellas se identificaron 2 con genotipo ST5 *pvl*⁺, que fueron parte del PT20 y una cepa ST1 *pvl*⁻ que perteneció al PT11, la cepa ST105 *pvl*⁺ parte del PT13 (figura 8). Finalmente, una cepa única (PT16) que no perteneció a un secuenciotipo ni grupo clonal, siendo su genotipo coincide con *SCCmec* I y *pvl*⁺, pero su ST no ha sido descrito (figura 8).

Tabla 10: Integración global de características pesquisadas en aislamientos de cepas SARM región de Valparaíso (n=44)

Complejo Clonal	Genotipo	Porcentaje	IC _{95%}
5	ST5 I <i>pvl</i> ⁺	36,4%	16,2%-57,6%
5	ST5 I <i>pvl</i> ⁻	9,1%	0,7%-26,7%
5	ST5 II <i>pvl</i> ⁺	2,3%	0,0%-16,3%
5	ST5 II <i>pvl</i> ⁻	2,3%	0,0%-16,3%

51

5	ST5 IV <i>pvl</i> ⁺	2,3%	0,0%-16,3%
8	ST8 I <i>pvl</i> ⁺	4,6%	0,0%-20,1%
8	ST8 IV <i>pvl</i> ⁺	22,7%	7,0%-43,4%
30	ST30 IV <i>pvl</i> ⁺	2,3%	0,0%-16,3%
5	ST105 II <i>pvl</i> ⁺	2,3%	0,0%-16,3%
5	ST225 II <i>pvl</i> ⁺	2,3%	0,0%-16,3%
5	ST225 I <i>pvl</i> ⁻	2,3%	0,0%-16,3%
NI	ST ^{NI} I <i>pvl</i> ⁺	2,3%	0,0%-16,3%
NT	No tipificable	9,1%	0,6%-26,1%

Se realizó una caracterización globalizada integrando las variables previamente descritas, resumiendo los diferentes genotipos pesquisados en el estudio, considerando ST, SCCmec y presencia o ausencia de gen *pvl*. *pvl*⁺ indica presencia del gen en el genotipo. *pvl*⁻ indica ausencia del gen en el genotipo. NI se refiere a cepa en que ST no ha sido descrito. NT indica cepas no tipificables por método utilizado en el tipo de SCCmec.

En resumen, los genotipos descritos, las ST5 I *pvl*⁺ presentaron antibiotipos I, III, IX, y XI, fueron aisladas de diferentes muestras, las cuales varían, siendo orina, secreciones, herida, tejido blando, aspirado traqueal y zonas no identificadas, su ubicación física fue en Hospital Dr. Gustavo Fricke, Hospital Carlos Van Buren y Hospital Santo Tomas de Limache, en los años 2017 y 2019 (figura 8). Las ST5 I *pvl* poseen los antibiotipos V, IX, XI y XII, fueron muestras de secreciones, tejidos blandos y zonas no identificadas con una ubicación física en la Universidad de Valparaíso y Hospital Dr. Gustavo Fricke en los años 2017 y 2019 (figura 8). La ST5 II *pvl*⁺ tuvo un antibiotipo IX y fue una muestra nasal aislada en la Universidad de Valparaíso el 2017 (figura 8). ST5 II *pvl* fue antibiotipo IX, se desconoce su muestra, la cual fue aislada en el Hospital Dr. Gustavo Fricke el 2019 (figura 8). La ST5 IV *pvl*⁺ fue de antibiotipo VII, aislada desde un tejido blando en el Hospital Carlos Van Buren el año 2019 (figura 8). Las cepas ST8 I *pvl*⁺ presentaron un antibiotipo I, se obtuvieron de secreciones y lavado bronco alveolar, aisladas en la Clínica Reñaca y Laboratorio Clínico de Valparaíso en el año 2017 (figura 8). Las cepas ST8 IV *pvl*⁺ correspondieron a antibiotipos I, II y IV, fueron aisladas desde secreciones, heridas, abscesos y orina, se aislaron en Hospital Dr. Gustavo Fricke, Hospital Carlos Van Buren y Laboratorio Clínico de Valparaíso en los años 2017, 2018 y 2019 (figura 8). La cepa ST30 IV *pvl*⁺ presentó un antibiotipo I, provino desde un absceso en el Hospital Carlos Van Buren en el año 2017 (figura 8). La ST105 II *pvl*⁺ tuvo un perfil de resistencia IX, fue aislada desde

52

orina en el Hospital Dr. Gustavo Fricke el año 2019 (figura 8). La cepa con genotipo ST225 II *pvl*⁺ presentó un antibiotipo VI, fue aislada en el Hospital San Camilo el año 2018 (figura 8). La ST225 I *pvl* fue de antibiotipo XI con un aislamiento nasofaríngeo realizado en el Hospital Dr. Gustavo Fricke el año 2019 (figura 8). La cepa ST^{NI} I *pvl*⁺, se le fue identificado un antibiotipo XI, fue aislada desde una secreción en el Hospital Carlos Van Buren el año 2019 (figura 8). Finalmente, las cepas NT presentaron antibiotipos VII, IX y XI, fueron aisladas desde secreción, tejido blando y muestras sin información provenientes desde Clínica Reñaca, Hospital Carlos Van Buren y Hospital Dr. Gustavo Fricke en los años 2017 y 2019 (figura 8).

8. DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con el objetivo de caracterizar cepas SARM dentro de la región de Valparaíso en Chile en el período de años 2017-2019, para así determinar las cepas circulantes dentro de la región y las características que la conforman, la importancia de su estudio radica en que SARM es un patógeno causante tanto de IAAS como de infecciones asociadas a la comunidad, estas últimas desde su aparición en la década de 1990 han aumentado su presencia a nivel internacional (6,10), siendo de interés la actualización constante de información respecto a ella y su evolución en el tiempo. A partir de lo anterior:

En este estudio el análisis por antibiótico mostró alta resistencia a eritromicina en las cepas SARM, en el estudio realizado por Medina *et al.* 2013 (27), en el sur de Chile del año 2013, al igual que en el presente, se presentaron resistencias a

eritromicina, clindamicina y quinolonas de manera común (en el sur de Chile con porcentajes de 97%, 96%, y 99%) (27), aunque en las cepas analizadas de la región de Valparaíso en el periodo 2017-2019 la resistencia a dichos antibióticos fue en menor cantidad, por otra parte, en el mismo estudio se presentó una resistencia a rifampicina en un 2%(27), siendo similar a lo adquirido en lo analizado en la presente tesis (con una resistencia de un 2,3 a rifampicina).

La resistencia a eritromicina y clindamicina son de importancia, debido a que en infecciones cutáneas se utilizan ambos medicamentos, en especial en pacientes con alergia a β -lactámicos, debido a que son infecciones causadas por cepas *S. aureus*, sin embargo, en el presente estudio, sumado a lo documentado previamente, se observa la presencia de cepas SARM resistentes a dichos antimicrobianos (17,27). Por otra parte, en relación al levofloxacino, es un medicamento utilizado en el tratamiento de rinosinusitis aguda en pacientes con alergia a β -lactámicos (17), se debe considerar que SARM puede generar también infecciones respiratorias, por lo cual, el que en el presente estudio presentó una resistencia de 59,1% es de importancia clínica.

Dentro del presente estudio se identificaron dos cepas SARM sensibles a oxacilina (OS-SARM), lo cual ha sido reportado previamente, actualmente se desconoce el mecanismo que explica dicha sensibilidad, pero se han pesquisado diferencias en búsqueda de dicha explicación (25), ambas poseían el gen *mecA* y con la aplicación de antibiograma se comprobó fenotípicamente su expresión, con lo anterior destaca la importancia de utilizar cefoxitina para la pesquisa de cepas SARM

54

con *mecA* en conjunto de oxacilina para su diagnóstico.

Respecto a vancomicina, tanto en el presente estudio como en los estudios mencionados, no se detectaron cepas resistentes al antimicrobiano en Latinoamérica (15,27,50). Es importante mantener su vigilancia, debido a que es una de las alternativas terapéuticas utilizadas para sus infecciones, en especial en ámbitos hospitalarios (6,11,17). En el presente estudio no se analizaron cefalosporinas de quinta generación (ceftarolina y ceftobiprol), las cuales también son alternativas para su tratamiento (6).

En relación a países de otro continente en relación al presente estudio, en España durante los años 2016 y 2017 en residencias de adultos mayores, donde de las cepas aisladas, presentaron resistencia a eritromicina, amikacina, clindamicina, levofloxacino, trobamicina y gentamicina en menor porcentaje, (importante considerar que el n de cepas SARM en dicho estudio fue de 11), a pesar de la cantidad de cepas SARM comparadas, tanto en dicho estudio de España como en la presente tesis, se observa la resistencia a eritromicina, clindamicina y levofloxacino (5). En cepas SARM

aisladas el 2016 en Irán, también se observó una alta resistencia a eritromicina, quinolonas (en dicho estudio se utilizó ciprofloxacino, en el presente levofloxacino) y clindamicina (3), en el mismo estudio de Irán hubo una proporción mayor de cepas SARM resistentes a gentamicina en relación a la presente tesis, donde hubo en proporción menor de cepas SARM resistentes a gentamicina; por otra parte, en la tesis actual no hubo resistencia a clotrimoxazol, mientras en Irán hubo en menor medida que los antimicrobianos previamente mencionados (3), esto último también se observa en un estudio de Palestina (4). El estudio de Palestina, de cepas SARM aisladas entre los años 2015 a 2017, también se detectó la resistencia de eritromicina de manera predominante, lo cual como se mencionó previamente, también sucedió en el estudio actual (4).

Los SCCmec tipificados en SARM dentro del estudio fueron mayoritariamente de los tipos tipos I y IV, lo cual coincide con lo previamente descrito a nivel tanto nacional como internacional (10,30). En relación a los perfiles de resistencia antimicrobiana y los tipos de SCCmec, los resultados presentados en esta investigación coincidieron con la literatura el perfil de antibiograma I (resistencia a penicilina, oxacilina y cefoxitina) y en relación al tipo de SCCmec IV, donde la resistencia es principalmente a antimicrobianos β -lactámicos (10,33). Los dos de los tres tipos de

55

SCCmec identificados en cepas SARM aislados en la región de Valparaíso, se han descrito principalmente en ámbitos hospitalarios (I y II) (10,21,33), los tipo IV se han determinado en situaciones de adquisición comunitaria (10,21), no obstante, el presente estudio no determinó en la totalidad de las cepas origen según AC o AH, se debe considerar que 42 de las 44 cepas fueron aisladas de infecciones de pacientes donde se desconoce la clasificación, mientras dos fueron aisladas en la comunidad pero en un ámbito particular como portación nasal en alumnos de las carreras de enfermería y medicina de la Universidad de Valparaíso y presentaban características asociables al origen hospitalario (SCCmec I y II) (10,33,51). En relación a los tipos de SCCmec en términos internacionales, se han identificado los 3 tipos de cassette identificados en el presente estudio, tanto en Sudamérica como en Irán o Palestina (3,4), no obstante, en Irán se aislaron cepas SARM con SCCmec tipo III principalmente (3), mientras en el estudio actual no se aislaron cepas con dicho cassette. En España en el período 2016-2017 en residencias de adultos mayores, se detectaron cepas SARM SCCmec tipo IV (5). Es de interés el profundizar la caracterización de las cepas, permitiendo analizar la evolución actual en relación con el origen de ellas.

La mayor parte de las cepas SARM aisladas dentro de la región de Valparaíso en el período 2017-2019 fueron *pvl*⁺, sin embargo, con un IC_{95%} altamente variable, el gen

pvl se detectó en forma transversal en los diferentes tipos de SCCmec I, II y IV, no obstante, siendo que con anterioridad las cepas SARM SCCmec IV eran mayoritariamente descritas como *pvl*⁺ tanto a nivel internacional y nacionalmente (4,10,21,27); por otra parte, los tipos I y II han sido caracterizados como *pvl*⁻ en otros estudios (10,27,30), sin embargo, de las 28 cepas que fueron tipificadas con dichos SCCmec, 22 fueron positivas a dicho gen, por otra parte, hay un reporte previo en Isfahán en Irán de cepas SARM recolectadas el 2016 donde identificaron cepas con SCCmec I *pvl*⁺ (3). Es importante considerar, la causa de un IC_{95%} altamente variable es relacionado al n de la tesis, razón por la cual los resultados actuales son de cepas circulantes en la región de Valparaíso en el período 2017 a 2019, pero no extrapolables y no permiten la medición de prevalencia de SARM en la región.

A pesar de que el presente estudio no clasificó a las cepas por SARM-AH o SARM-AC debido al desconocimiento de dicha característica al no tener acceso a fichas clínicas de usuarios para establecer origen, no obstante, si se encontraron cepas que han sido descritas por su SCCmec situaciones hospitalarias (tipos I-II) (6,21), con

ausencia del gen *pvl*, mientras los SCCmec tipos IV y V se han reportado como comunitarias y *pvl*⁺ (4,27,52), sin embargo, se han visto situaciones tanto hospitalarias donde se observa el gen *pvl* (lo cual a su vez genera cuestionamientos del origen de la cepa) (6,21,51) y comunitarias donde no se detecta el gen de forma reglamentaria (5,11,33), incluso, se han reportado cepas como la USA300 aislada en ambas situaciones (5,24), por lo cual, hoy en día el uso del gen *pvl* y tipo de SCCmec como características definitorias de un aislamiento AH o AC es debatible a raíz de la evolución de las cepas SARM (10,21,52).

Al realizar el análisis de las cepas SARM, se obtuvo gran diversidad genética, de los 44 aislados se obtuvieron una alta cantidad de pulsotipos y de dichos grupos se identificaron 4 complejos clonales, de ellos, se han descrito internacionalmente y en Latinoamérica los CC5 y CC8 (4,11,27), en el caso del CC5 se ha identificado en la literatura principalmente asociados a adquisición hospitalaria (10), en el caso de los CC8 y CC30 también han sido asociado tanto a adquisición hospitalaria y adquisición comunitaria en cepas con secuenciotipos 8 y 30 de dichos complejos respectivamente (10,15), en Chile se han aislado cepas SARM de los 3 complejos clonales mencionados (11,15,27). Por otra parte, durante el año 2021 se publicó un estudio realizado en México de cepas *S. aureus* recolectadas desde el año 2006 a 2019 aisladas desde usuarios pediátricos en un hospital, caracterizándolas, en relación a dicho estudio, las cepas SARM presentaron los CC5, CC30 y CC8, donde predominó el CC5 en ellas, de igual manera que el presente estudio, por otra parte, en el estudio mencionado no

hubo una alta prevalencia de *pvl* en las cepas (50), en el presente estudio sucedió lo contrario, lo cual es una temática de preocupación por las complicaciones que puede generar el factor de virulencia de PVL en los usuarios hospitalizados con infección de *S. aureus* al ser un factor que induce a la necrosis tisular (21,50).

En cuanto a las relaciones genéticas de las cepas. De los 2 grupos mayoritarios, de 10 y 7 cepas, el primero correspondiente al PT16 se compuso por un clon transversal a los años de estudio, siendo una cepa SARM que común que se diseminó en el tiempo (al haber sido aislado en diferentes centros asistenciales de ciudades contiguas), con aislamiento desde el Hospital Carlos Van Buren, Hospital Gustavo Fricke, Clínica Reñaca, dicho clon se caracterizó por poseer un SCCmec IV, lo cual se ha reportado en Valdivia en Chile (27), de las 9 cepas que lo conformaron, una mayoría fueron resistentes solo a β -lactámicos, lo cual ha sido descrito previamente,

57

sin embargo, hay 1 cepa que fue resistente a eritromicina y levofloxacino a pesar de poseer el SCCmec que no posee genes de resistencia a dichos antimicrobianos (10). Por otra parte el segundo grupo mayoritario (PT20) correspondieron a cepas dentro de las ciudades de Viña del Mar y Valparaíso, son del CC5 el cual se ha diseminado en Latinoamérica y también ha sido descrito en Chile (10,16,27), al respecto, sería interesante realizar un análisis actual de relación genética con cepas del presente año. Los SCCmec del PT20 (exceptuando por aquellas cepas en que no se pudo tipificar) al ser de tipos de mayor tamaño que el tipo IV (6,10) y están asociados a resistencia a antibióticos β -lactámicos y otras familias (10), al igual que en el estudio realizado por Medina *et al.* 2013 (27), las cepas de dicho grupo con SCCmec I en el presente estudio también fueron resistentes a clindamicina, eritromicina, gentamicina y quinolonas (siendo en Medina *et al.* 2013, usado el ciprofloxacino y en la presente tesis el levofloxacino) (27).

Es importante reconocer, que tres de los complejos clonales detectados en las cepas SARM (CC5, CC8, CC30), provienen originalmente de linajes de cepas SARM reconocidos como epidémicos (28), de ellos, lo más diseminados mundialmente corresponden al CC5 y CC8 (10,16,28) y tanto ellas como el CC30 han sido reportados previamente en Chile (11,27), aunque en el caso del CC30 la cepa reportada previamente poseía un ST731 (11), mientras la del estudio actual al ST30. Por otra parte, las cepas SARM del CC8 se ha relacionado a diferentes tipos de SCCmec y con factores de virulencia como *pvl*, siendo potencialmente cepas más virulentas (10,11,27,51), dicha característica se observó en cepas SARM del presente. Por otra parte, las cepas CC1 poseen menor diseminación que las anteriores en Latinoamérica, siendo ubicadas principalmente en Norteamérica, Europa y Asia (10,16).

Respecto a los genotipos detectados, destacan el ST5 I *pvl*⁺ con la mayor prevalencia, son cepas de diferentes ciudades y años (figura 8), que no necesariamente están en su totalidad relacionadas genéticamente (al pertenecer a diferentes pulsotipos) (figura 8, tabla 10). De dichas cepas SARM (16 aislados), 13 son asimilables en términos fenotípicos y genotípicos al clon chileno/cordobés, variando de él al ser *pvl*⁺ lo cual o ha sido reportado previamente, no obstante, presentan las características del antibiograma, SCCmec y secuenciotipo (10,27), fueron cepas aisladas desde secreciones, tejidos blandos y aspirado traqueal.

58

Por otra parte, el segundo genotipo que destaca fue el ST8 IV *pvl*⁺, representa al segundo grupo más prevalente de la muestra, es un linaje diseminado en el período 2017-2019 y son 2 clones que presentan relación genética (PT12 como cepa sin relaciones genéticas y PT16), existen reportes previos de cepas con dichas características internacionalmente, entre ellas destaca la diseminación de cepas USA300 (a la cual las cepas de la presente tesis fueron asimilables, pero, se desconoce el subtipo de SCCmec IV y si es ACME positivo o negativo para establecerlo (4,27,53)). La SARM USA300 antiguamente era clasificada SARM-AC, reportando en EEUU predominando como causante de infecciones por SARM (24), parte de su propagación internacional se asocia a la emigración, pesquisada en Ecuador, Perú, Colombia y Venezuela(10), siendo hoy una cepa no exclusiva de EE.UU, sumado a lo anterior, se debe considerar la variante USA300 LA, a través de los años se ha visualizado un aumento en la presencia de USA300 presencia a nivel hospitalario en diferentes países, desplazando a cepas en la microbiota hospitalaria (24,54). USA300 se ha reportado en diferentes zonas del mundo como Corea del Sur, Nueva York, Europa, Latinoamérica, entre otros, instalando la discusión sobre su clasificación, siendo una cepa de aislamiento mixto (10,24,53). Por otra parte, se ha reportado cepas USA300 con tendencia a la resistencia a ciprofloxacino (10), sin embargo, las caracterizadas en el estudio como ST8 IV *pvl*⁺ son sensibles, siendo en su mayoría resistentes solo a betalactámicos y provenientes de abscesos.

Las cepas ST5 I *pvl*⁻, representaron una menor prevalencia de las cepas SARM analizadas, en características coinciden con lo descrito previamente para el clon chileno/cordobés aislado en Chile y en Argentina, con resistencia a eritromicina y clindamicina, exceptuando por una cepa que posee las características genéticas, mas no el fenotipo de resistencia al ser sensible a eritromicina (27), estaría diseminado en diferentes ciudades y en diferentes años dentro de la región de Valparaíso, a pesar de ser un clon conservado, las cepas que presentaron dicho perfil no presentaron relación

genética entre ellas. Es importante considerar que es un clon predominante en Chile que se ha diseminado en la región sudamericana (27,29), en el presente estudio no fue predominante, no obstante, se presentaron cepas con características similares (ST5 I *pvl*⁺), destacaron en cuanto a su alta proporción.

El restante de genotipos fue minoritario en cuanto a porción en el estudio, siendo los ST8 I *pvl*⁺, Los ST5 II *pvl*⁺, ST5 II *pvl*⁻ (asimilable al clon new york/japón)

59

(28,53), ST5 IV *pvl*⁺ (equiparable al clon pediátrico) (21), ST30 IV *pvl*⁺, ST105 II *pvl*⁺, ST225 II *pvl*⁺, ST225 I *pvl*⁻ y 4 cepas no tipificables, algunos de ellos han sido descritos previamente en la literatura, por otra parte, se presentan clones como el new york/japón donde existe un vacío respecto a la presencia o ausencia de gen *pvl*, generalmente asociado a cepas negativas al gen por ser de origen hospitalario, pero no se ha tipificado como tal (10).

En el estudio se han mencionado los clones como asimilables, debido a que existen otras características que tipifican a los clones, como la tipificación del gen *spa* o la presencia o ausencia de ACME (10,16,27,54).

Finalmente, es importante considerar que en Latinoamérica se han identificado como clones diseminados las cepas chilena/cordobés, pediátrica y la new york/japón (30).

A pesar de la amplia variedad de genotipos de las cepas, la gran parte de ellos pertenecieron a los complejos clonales descritos a nivel mundial distinguiendo 5 variedades (CC5, CC8, CC30, CC1 y no tipificado), lo cual implica que provinieron de ancestros comunes y a pesar de ello, no todas poseen relación genética. Lo anterior se puede explicar por qué el PFGE separa fragmentos del ADN de cada bacteria y establece similitudes entre un grupo finito de cepas en base a presencia o ausencia de sitios de restricción de *Sma*I, debido a mutaciones puntuales, deleciones o inserciones estas pueden ocurrir en un tiempo relativamente corto de la evolución de una cepa al duplicarse en cada generación, sin embargo, en el MLST se identifican siete genes housekeeping para establecer su linaje genético por el ST y CC que no cambia tras un tiempo de evolución corto (10,32). Por otra parte, es esperable una cercanía genética en cepas con ST similares, la relación genética tiende a estrecharse en cepas que son cercanas entre sí en el espacio-tiempo, por lo cual el PFGE es una herramienta que permite identificar brotes de forma local al haber cepas que se relacionan entre sí (5,26,32), lo cual se observó en el PT20 del estudio, donde diferentes cepas de un mismo establecimiento y aisladas en un mismo período de tiempo, tuvieron relación entre sí. Al igual que en el presente estudio, existen reportes previos donde cepas que poseen el mismo ST no siempre están genéticamente relacionadas por PFGE (30), esto

significa que a pesar de pertenecer a un complejo clonal común, son cepas que provienen de diferentes orígenes.

60

A partir de las diferentes características pesquisadas en el estudio, identificando rasgos previamente descritos en la literatura en diferentes aspectos de las bacterias SARM, también en la muestra aparecieron variantes, unas en mayor cantidad que otras, es por ello que es importante, que a pesar de que en el país hay una búsqueda activa de cepas SARM-AC, a través de la presente investigación nace el cuestionamiento respecto a reforzar la investigación en la evolución genética que cepas SARM están presentando en el país independiente de su origen, manteniendo una vigilancia epidemiológica activa para generar enfoques preventivos en la salud.

9. CONCLUSIONES

Las cepas SARM estudiadas aisladas de pacientes que acudieron a centros de salud dentro de la región de Valparaíso en los años 2017-2019 presentaron las siguientes características:

1. Antibiotipos diversos, predominando tres de ellos; uno con resistencia exclusiva a β -lactámicos, seguido de antibiotipos con multirresistencia a β -lactámicos, macrólidos, lincosamidas, quinolonas y aminoglucósidos.
2. Los tipos de cassette *SCCmec* fueron I (54,6%), II (9,1%) y IV (27,3%), los cuales se han identificado previamente en cepas SARM humanas.
3. Gran parte de las cepas fueron portadoras del gen de la Leucocidina de Pantón Valentine (84,1%), con una distribución homogénea entre los diferentes tipos de cassette *SCCmec*.
4. Los complejos clonales detectados coinciden con los descritos en Latinoamérica CC5 (65,9%) y CC8 (27,3%) reconocidos como epidémicos. Los principales genotipos identificados fueron ST5-I-*pvl*⁺ (CC5) y cepas equivalentes a clon USA300 (CC8) y al clon chileno/cordobés (CC5).
5. Se sugiere realizar estudios de monitorización a futuro en consideración de la evolución constante de las bacterias.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. Octava edición. Barcelona: Elsevier España; 2017. 170–185 p.
2. Rocchetti TT, Martins KB, Martins PYF, de Oliveira RA, Mondelli AL, Fortaleza CMCB, *et al.* Detection of the *mecA* gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. *Brazilian J Infect Dis.* 2018;22(2):99–105.
3. Sedaghat H, Esfahani BN, Halaji M, Jazi AS, Mobasherizadeh S, Havaei SR, *et al.* Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains from a teaching hospital in isfahan, Iran: The emergence of MRSA ST639-SCC*mec* III and ST343-SCC*mec* III. *Iran J Microbiol.* 2018;10(2):82–9.
4. Hadyeh E, Azmi K, Seir RA, Abdellatief I, Abdeen Z. Molecular Characterization of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in West Bank-Palestine. *Front Public Heal.* 2019;(7):130.
5. Galán-Sánchez F, Pérez-Eslava M, Machuca J, Trujillo-Soto T, Arca-Suarez J, Rodríguez-Iglesias M. *Staphylococcus aureus* carriage in older populations in community residential care homes: Prevalence and molecular characterization of MRSA isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019;37(3):172–5.
6. Aguayo-Reyes A, Quezada-Aguiluz M, Mella S, Riedel G, Opazo-Capurro A, Bello Toledo H, *et al.* Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Rev Chil infectología.* 2018;35(1):7–14.
7. García-Betancur JC, Lopez D. Cell Heterogeneity in Staphylococcal Communities. *J Mol Biol.* 2019;431(23):4699–711.
8. Zavaleta G, Saldaña J, Jauregui S, Pacherez D, Rivera M, Samanamud F, *et al.* Efecto antibacteriano de nanopartículas de ZnO sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*. *Arnaldoa.* 2019;26(1):421–32.
9. Organización Panamericana de la Salud. Peligros biológicos [Internet]. Available from:
https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es
10. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):e00020-18.
11. Acuña M, Benadof D, Jadue C, Hormazábal JC, Alarcón P, Contreras J, *et al.*

- Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad (SARM AC): comunicación de los primeros cuatro casos pediátricos descritos en Hospital de Niños Roberto del Río. Rev Chil infectología. 2015;32(3):350–6.
12. Tromp AT, van Strijp JAG. Studying Staphylococcal Leukocidins: A Challenging Endeavor. Front Microbiol. 2020;11:611.
 13. Haghi F, Zeighami H, Hajiloo Z, Torabi N, Derakhshan S. High frequency of enterotoxin encoding genes of *Staphylococcus aureus* isolated from food and clinical samples. J Heal Popul Nutr. 2021;40(1):27.
 14. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of B-Lactamase-Producing Pathogens. Clin Microbiol Rev. 2020;33(2):e00047-19.
 15. ISP. Vigilancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirido en la comunidad. Chile, 2012-2016. [Internet]. Vol. 3, Boletín ISP Abril. Chile: Instituto de Salud Pública de Chile; 2017. p. 2012–6. Available from: http://www.ispch.cl/sites/default/files/S_aureus_comunitario19-07-2013_final.pdf
 16. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers H. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2010;375(9725):1557–68.
 17. MINSAL. Orientación técnica para el uso de antibióticos en infecciones comunitarias de manejo ambulatorio 2021. Chile: Ministerio de Salud de Chile; 2021. p. 1–40.
 18. Okolie CE, Wooldridge KG, Turner DPJ, Cockayne A, James R. Development of a heptaplex PCR assay for identification of *Staphylococcus aureus* and CoNS with simultaneous detection of virulence and antibiotic resistance genes. BMC Microbiol. 2015;15:157.
 19. Craft KM, Nguyen JM, Berg LJ, Townsend SD. Methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. Medchemcomm. 2019;10(8):1231–41.
 20. Ji Y. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols: Cutting-Edge Technologies and Advancements. Tercera edición. Yinduo Ji, editor. Methods in Molecular Biology. 2020.
 21. Andrade MM, Luiz WB, Da Silva Oliveira Souza R, Amorim JH. The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2020;2020:1721936.
 22. Urushibara N, Aung MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type XIV (5A) and a truncated SCC*mec* element in SCC composite islands carrying *speG* in ST5 MRSA in Japan. J Antimicrob Chemother. 2020;75(1):46–50.

23. Hao H, Dai M, Wang Y, Huang L, Yuan Z. Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2012;7(11):1315–29.
24. Vasquez Guillaumet C, Vazquez R, Deaton B, Shroba J, Vasquez L, Mercier R-C. Host – pathogen – treatment triad : host factors matter most in MRSA bacteremia outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(2):e01902-17.
25. Xinlong H. Membrane Vesicles are the dominant structural components of Ceftazidime-induced Biofilm Formation in an Oxacillin-Sensitive MRSA. *Front Microbiol.* 2019;10:571.
26. Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández Á. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(SUPL 1):20–5.
27. Medina G, Egea AL, Otth C, Otth L, Fernández H, Bocco JL, *et al.* Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Southern Chile. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(12):1533–40.
28. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:629–41.
29. Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L, *et al.* Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis.* 2010;14(7):560–6.
30. Moreno Mochi P, Vargas JM, Vivaldo S, Bottiglieri M, López C, Mochi S, *et al.* Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from different population groups in Argentina. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;23:82–6.
31. MINSAL. Estado actual del programa nacional de control de infecciones asociadas a la atención en salud (PCI) y sus proyecciones. [Internet]. Ministerio de Salud de Chile; 2017 [cited 2018 Nov 1]. Available from: <http://www.sochinf.cl/portal/templates/sochinf2008/documentos/2017/presentaciones/iaas/1008/1.pdf>
32. Castellano-gonzález MJ, Perozo-mena AJ, Vivas-vega RL, Ginestre-pérez MM, Rincón-villalobos GC. Tipificación molecular y fenotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (SAMR) en un hospital universitario. *Rev Chil Infect.* 2009;26(1):39–48.
33. Albarrag A, Shami A, Almutairi A, Alsudairi S, Aldakeel S, Al-Amodi A.

Prevalence and Molecular Genetics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Nursing Homes in Saudi Arabia. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2020;2020:2434350.

34. INE. Síntesis de resultados CENSO 2017. Chile: Instituto Nacional de Estadística; 2018. p. 1–27.
35. MINSAL. Decreto 158. Chile: Ministerio de Salud de Chile; 2004. p. 1–5.
36. MINSAL. Decreto 7 Aprueba el reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria y su vigilancia. Chile: Ministerio de Salud de Chile; 2020. p. 1–7.
37. ISP. Norma Técnica N°175 Vigilancia nacional de resistencia a los antimicrobianos en agentes que pueden producir Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS). Chile: Instituto de Salud Pública de Chile; 2019. p. 1– 10.
38. Hernández Betancourt, Oscar; Ulloa Cuesta Y, Del Río Méndez D, Galdós M del C. *Staphylococcus aureus* y su identificación en los laboratorios microbiológicos. AMC, Camagüey. 2005;9(1):142–52.
39. Chiong Lay M, Leisewitz Velasco A, Márquez Romegialli F, Vironneau Janicek L, Álvarez Santana M, Tischler N, et al. Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados – Fondecyt – CONICYT. Chile: Ministerio de Salud; 2018.
40. Favi Cortés M, Jiménez Salgado M, Martínez Aguilar C, Olivares Vicencio B, Ramírez Muñoz V, Scappataccio Bordón A. Guía de Bioseguridad para laboratorios clínicos [Internet]. Instituto de Salud Pública. Chile: Instituto de Salud Pública; 2013. p. 1–46. Available from: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/08/Manual Bio-30082013B.pdf>
41. López Martínez B, Alcázar López V, Castellanos Cruz M del C, Franco Hernández MI, Jiménez Tapia Y, De León Ham A, et al. Vigilancia institucional de la susceptibilidad antimicrobiana en patógenos de interés clínico. Bol Med Hosp Infant Mex. 2013;70(3):222–9.
42. Hon PY, Chan KS, Holden MT, Harris SR, Tan TY, Zu Y-B, et al. Arginine Catabolic Mobile Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Clonal Group ST239-MRSA-III Isolates in Singapore: Implications for PCR-Based Screening Test. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(3):1563–4.
43. Irene MC, Mira O. M, Álvarez A. I, Cofre J, Cohen V. J, Donoso W. G, et al. Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* metilino resistente. Rev Chil pediatría [Internet]. 2009;80(1):48–53. Available from: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-

44. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Vigésimo octava edición. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. 54–62 p.
45. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Décima. Vol. 35. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. 1–87 p.
46. Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Møller JA, Westh H. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I–V. Clin Microbiol Infect. 2007;13(7):725–7.
47. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, De Ryck R, Struelens M, Elberg Zinn C, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing t. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1574–85.
48. Delgado S, García P, Fernández L, Jiménez E, Rodríguez-Baños M, Del Campo R, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011;62(2):225–35.
49. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33(9):2233–9.
50. Vazquez-Rosas GJ, Merida-Vieyra J, Aparicio-Ozores G, Lara-Hernandez A, De Colsa A, Aquino-Andrade A. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Obtained from Blood Cultures of Paediatric Patients Treated in a Tertiary Care Hospital in Mexico. Infect Drug Resist. 2021;14:1545–56.
51. Martínez Medina RM, Montalvo Sandoval FD, Magaña Aquino M, Terán Figueroa Y, Pérez Urizar JT. Prevalencia y caracterización genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina aisladas en un hospital regional mexicano. Rev Chil Infectol. 2020;37(1):37–44.
52. Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, et al. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microb Pathog. 2016;101:56–67.
53. Bride L de L, Pereira MF, Barbosa MC, Silva NC, Klein NM, Nascimento TC, et al. Differences in resistance profiles and virulence genes among methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of different lineages at a public tertiary hospital. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;52:e20190095.

54. Vanegas Múnera JM, Ocampo Ríos AM, Urrego DM, Jiménez Quiceno JN. In vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections to vancomycin, daptomycin, linezolid and tedizolid. Brazilian J Infect Dis. 2017;21(5):493–9.

11. ANEXOS

El presente anexo consiste en la carta de eximición del comité de ética del Hospital Dr. Gustavo Fricke:

A. Carta eximición comité de ética Hospital Gustavo Fricke

epidemiológicas y en salud pública, investigaciones psicológicas, antropológicas y sociales.

Que el Proyecto presentado se titula y se trata de la: "Caracterización genética y antibiograma de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) de origen hospitalario y comunitario aisladas de la V región de Chile, durante el período 2017 – 2019".

Por lo tanto se trata de un Estudio sin interacción con seres humanos y su desarrollo implica interactuar con especímenes patológicos que se encuentran guardados de manera Anonimizada en el ISP y Establecimientos Hospitalarios de la Quinta Región.

De tal manera que el Comité está en condiciones, de acuerdo a las recomendaciones nacionales e internacionales, de Certificar la eximición de Consentimiento Informado y de una Evaluación Ética y Científica del Estudio señalado.

Para mayor abundamiento se puede señalar que:

- Los "Sujetos de Investigación" corresponderán a cepas de origen comunitario y hospitalario, y que dichas cepas corresponden a cepas de estudios de los años 2017-2019 y que son guardadas en forma codificada tanto en el ISP como en Hospitales, de manera que existe un proceso de Anonimización que impide conocer datos sensibles de los sujetos de origen de las cepas.

- Que el Estudio no utilizará de forma directa las secreciones de los usuarios participantes, solo se utilizarán cultivos obtenidos de estudios del período 2017-2019, de Hospitales de la V Región y del ISP, y que la participación, hecha la invitación, es de carácter voluntario y que cada Establecimiento posee la libertad retirarse de la investigación en el momento que requieran y en caso de participar, poseen la libertad de estimar la cantidad de cepas que donarán al estudio.

- Que la obtención de las cepas de origen del ISP y de los Hospitales no supone riesgos para los usuarios de origen debido a que no se dispondrá información personal ni sensible de ellos.

- Que están contempladas medidas de minimización de riesgos para el personal manipulante de las cepas el cual está definido como de nivel moderado y el riesgo para la comunidad es bajo, la IP garantiza que se trabajará con niveles de bioseguridad 2, acorde a lo propuesto por el Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados – Fondecyt – CONICYT 2018.

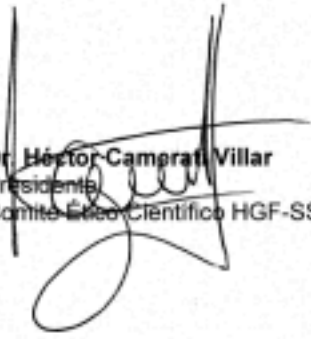
- Que es importante conocer los cambios que podría presentar los diferentes clones de SAMR actuales, considerando el aumento de la migración en Chile, que se desconoce las características de las cepas SAMR que se han identificado, y que la vigilancia epidemiológica realizada por el ISP de cepas caracterizadas como SAMR-AC se estudió la susceptibilidad a antibióticos, sin embargo es una cepa que está en constante cambio en relación a variaciones demográficas, siendo

importante conocer las similitudes y diferencias que podrían presentar las cepas actuales de SAMR, como una manera de contribuir al utilizar cepas de estudios de la UV y recolectadas del ISP y Hospitales de la V región, no existen beneficios directos para usuarios de origen, sin embargo, se brindará información a investigadores anteriores, Hospitales de los cuales se recolectarán cepas y al ISP sobre los resultados obtenidos en la investigación una vez finalizada. **Por lo que el aporte de la investigación** será brindar información de las características actuales de cepas de *S. aureus* metilicilino resistente dentro de la V región de Chile, generando información genética y microbiológica de cepas presentes en el territorio nacional, aportando a su vez a la epidemiología de la cepa presente y su evolución.

De igual manera se obtendrán conocimientos sobre los antibióticos actuales a los cuales son sensibles y resistentes, lo cual podrá ser utilizado posteriormente como información útil en las actividades clínicas a nivel regional. (Valor Social, Valor Científico y Valor Clínico).

Como conclusión este Comité, no encuentra Reparos Científicos ni Éticos en esta Investigación, dado que se toman todos los resguardos respecto de los "Sujetos de Investigación" y la no vinculación a los sujetos humanos de los cuales provienen las Cepas, establecen la autonomía de los Establecimientos a participar, que analiza en profundidad los análisis de Riesgos de la Investigación y establece claramente los Beneficios de la misma. Por tanto debe señalarse que los Establecimientos Hospitalarios que deseen participar, como una contribución al conocimiento y la ciencia, solo les cabe asegurar la Anonimización de las Muestras que se entreguen.

Saluda atentamente a Ud.


Dr. Héctor Camerati Villar
Presidente
Comité Ético Científico HGF-SSVQ

HCV/lgr:
Cc/
Archivo CEC.

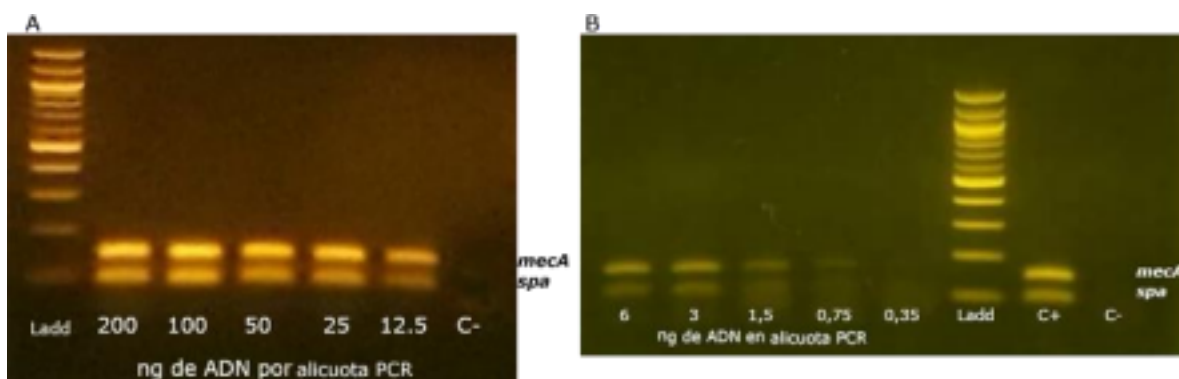


Figura 3: Límite de Muestra el resultado de 2 geles de agarosa utilizados para

la electroforesis posterior a PCR en genes *mecA* y *spa*. A: Columnas de derecha a izquierda corresponden al patrón de marcador del tamaño molecular 100 pb DNA Ladder (New England, Biolabs) (Ladd), de los resultados de cada PCR con el orden decreciente de cantidad de ADN genómico en nanogramos, la columna C- corresponde al control negativo (No hay amplificación de genes). B: Primera a quinta columna con cantidad de ADN genómico en nanogramos, se observa la disminución en la amplificación de ADN, Sexta columna corresponde al patrón de marcador del tamaño molecular 100 pb DNA Ladder (New England, Biolabs), séptima columna (C+), finalizando la octava columna con C- (No hay amplificación).

Se obtuvo una detección óptima de ambos genes *spa* y *mecA* con 200 y 100 ng de ADN en cuanto a los amplicones, a pesar de que el gen *mecA* se observa en menores cantidades de ADN, el gen *spa* se ve afectado inmediatamente (figura 3A). El límite para detectar los genes de interés es de 0,75 ng de ADN por reacción de PCR, en donde aún se observa la amplificación de los genes estudiados, sin embargo, con una amplificación menor, lo cual se exagera a los 0,35 ng en donde no hay distinción de los genes, perdiendo la capacidad de detección (figura 3B).