

## *Staphylococcus aureus*: De la genómica a la clínica

**Dr. Agustín De Colsa Ranero**

Médico Adscrito al Departamento de Infectología Pediátrica  
Jefe del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Patógenos y Virología en Investigación  
Instituto Nacional de Pediatría  
México.

El *Staphylococcus aureus* representa uno de los principales patógenos de importancia clínica en el humano, su distribución es mundial y el impacto en la morbi-mortalidad es considerable no solamente en las infecciones hospitalarias sino ahora también a nivel comunitario. El *S. aureus* es sin duda uno de los patógenos protagonistas en la actualidad, de ahí la importancia de conocer algunos de sus fundamentos genómicos aplicados en el escenario clínico.

Desde el punto de vista genómico, es elemental resaltar la importancia de los elementos genéticos móviles (EGM) que el *S. aureus* utiliza para transferir información genética que le permite determinar su resistencia a antimicrobianos, así como adquirir diversos factores de virulencia. Los EGM no son más que segmentos de DNA que se transmiten en forma horizontal, ya sean como secuencias de inserción, transposones, fagos, plásmidos, islas de patogenicidad y cassettes cromosómicos<sup>1</sup>. Hay que resaltar que estos segmentos de DNA no sólo se transmiten en forma horizontal, sino también están ampliamente propagados en la transmisión vertical a través de la progenie bacteriana.

### Factores de virulencia

El alto grado de patogenicidad del *S. aureus* es conocido debido a la importante producción de enzimas extracelulares que permiten la penetración e invasión de los diferentes tejidos (coagulasa, proteasas, metaloproteasas, hialuronidasas, lipasas y fosfolipasa C). Otros compuestos permiten la adherencia, como son las proteínas de unión a fibronectina, la colágena y diversos factores de agregación. Su persistencia sobretodo en materiales sintéticos (ej. catéteres), está predominantemente inducida por diferentes polisacáridos de adhesión que favorecen la producción de biofilm. Entre las toxinas conocidas, destacan las hemolisinas, las

diferentes enterotoxinas -principalmente la Q y K-, la toxina exfoliativa, la toxina del síndrome de choque tóxico (SSTT), otros super-antígenos estafilocócicos y finalmente las leucocidinas.<sup>2,3</sup> De todas las leucocidinas conocidas, la leucocidina Pantón-Valentín (LPV) y su expresión como subunidades *lukS-PV* y *lukF-PV* (ambas derivadas del locus *pvl*)<sup>4</sup>, han sido objeto de una profunda investigación, dada su conexión con muchas de las cepas de *S. aureus* meticilino-resistente adquirido en la comunidad (SAMR-AC), ya que dichas cepas comunitarias, comúnmente producen dicha citotoxina, mientras que las cepas de *S. aureus* meticilino-sensible (SAMS), así como las cepas de *S. aureus* meticilino-resistente adquiridas hospitalariamente (SAMR-AH) no suelen portarla<sup>5,6</sup>. El efecto de la LPV es formar poros heptaméricos en las membranas de los leucocitos, causando destrucción de los mismos. Desde el punto de vista clínico, estas cepas LPV(+), tienden a causar infecciones de piel y tejidos blandos como furunculosis (93%), abscesos cutáneos (50%) e incluso neumonías rápidamente progresivas con un alto grado de fatalidad.<sup>2,3</sup> Sin embargo, en otro tipo de infecciones como endocarditis, síndrome de shock tóxico y mediastinitis entre otras, se han asociado a cepas SAMR-LPV(-). Es por esto que el rol determinante de la LPV como factor de virulencia, aún sigue siendo motivo de controversia, por lo que se estudia la posible combinación de factores de virulencia, principalmente la co-participación de otros factores, principalmente la proteína A y las hemolisinas alfa y gamma. Adicional a ello, se le ha dado un giro a las investigaciones para analizar también el papel de los genes reguladores de expresión como son el *agr*, *spa*, *sar* y *sigB*. De estos, el gen regulador accesorio *agr*, parece jugar un papel fundamental, ya que regula varios genes de virulencia como son las diferentes hemolisinas, leucocidinas y la LPV.<sup>2,3</sup>

## Resistencia Antimicrobiana

**1. Resistencia a Penicilina.** Solamente bastó unos cuantos años para que el *S. aureus* generara resistencia a la penicilina después de su introducción para su uso clínico; así, a finales de los años 50's y principios de los 60's, la resistencia a la penicilina por este agente era pandémico; en la actualidad, más del 90% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a la penicilina, esta resistencia está generada por una beta-lactamasa que hidroliza el anillo beta-lactámico, inactivando la acción de la penicilina. Esta beta-lactamasa se encuentra codificada en el gen *blaZ*, que está sujeto a una estrecha regulación por los genes *blaI* y *blaR*; todos estos genes se pueden encontrar a nivel cromosómico, o bien a nivel de transposones, lo cual le permite transferencia horizontal.<sup>1</sup> Dada la alta prevalencia de *S. aureus* resistente a la penicilina a nivel mundial, ésta no se considera más como un antibiótico de utilidad para infecciones por *S. aureus*.

**2. Resistencia a Meticilina.** A finales de los años 50's surgió la meticilina, que fue diseñada para tratar las infecciones por *S. aureus*, que fueran penicilino-resistentes, sin embargo, la resistencia a la meticilina rápidamente surgió, reportándose así el primer caso de SAMR en 1961 (Inglaterra). El uso de la meticilina se limitó por su toxicidad renal, además de que aparecieron otras isoxazolil-penicilinas (dicloxacilina, oxacilina, etc.), que remplazaron rápidamente a este agente. La resistencia a meticilina quedó como un referente nominal tanto a nivel clínico como de laboratorio, a pesar de que la meticilina no se usa ni a nivel clínico ni a nivel de laboratorio para documentar la resistencia a la misma. Lo que es importante enfatizar para el clínico, es que el *S. aureus* meticilino-resistente (SAMR) indica que ningún beta-lactámico con actividad anti-estafilocócica (dicloxacilina, cefalosporinas de 1ª-2ª generación, carbapenémicos, etc.), tienen acción contra dicho agente. Esta resistencia está generada por la producción de proteínas de unión a penicilina tipo 2ª (PBP2a) que presentan baja afinidad para unirse a aquellos beta-lactámicos con actividad anti-estafilocócica.<sup>6</sup> En condiciones normales, dichos beta-lactámicos se unen a la PBP nativa que se encuentra en la pared estafilocócica, inhibiendo así la biosíntesis de peptidoglicano. Lo que determina la resistencia a la meticilina es la adquisición del gen *mecA*, el cual codifica la PBP2a. El gen *mecA*, de 2.1 kb en longitud, se localiza en una isla genómica móvil, denominada *Cassette Cromosómico Estafilocócico mec* (SCCmec). Este cassette además del gen *mecA*,

contiene genes reguladores y secuencias de inserción que flanquean precisamente al *mecA*. Adicional a ello, contienen el complejo genético denominado *ccr*, que codifica para las recombinasas *ccrA*, *ccrB* y *ccrC*, que son sitio-específicas y permiten la movilidad del SCCmec entre las cepas estafilocócicas.<sup>1,5</sup> Hasta la fecha son 8 tipos de SCCmec identificados<sup>1</sup>, de los cuales es importante mencionar que los tipos I, II y III de SCCmec son cepas de SAMR-AH y que característicamente son LPV(-), sin embargo, ya que son cassettes cromosómicos relativamente grandes, estos permiten alojar un mayor número de genes de resistencia para otros agentes antimicrobianos, es por esto que las cepas hospitalarias tienen una mayor co-resistencia, comportándose auténticamente como multidrogo-resistentes (MDR), requiriendo esencialmente manejo con glucopéptidos.<sup>5,6</sup> Por el contrario, los tipos IV y V de SCCmec son LPV(+) y estos característicamente son cepas de SAMR-AC que tienden a dar un mayor número de infecciones de piel y tejidos blandos y neumonías necrosantes; estos cassettes al ser más pequeños, no permiten alojar demasiados genes de resistencia para otros agentes diferentes a los beta-lactámicos, es por ello que las cepas comunitarias tienen menor co-resistencia, y es lo que permite antibióticos alternativos como es la clindamicina, el TMP/SMX, tetraciclinas y rifampicina entre otras.<sup>5,6</sup> Ahí radica la importancia de conocer si la cepa de SAMR es de adquisición comunitaria u hospitalaria, ya que tiene implicaciones clínicas, de resistencia y de elección antimicrobiana. Recientemente han aparecido los primeros beta-lactámicos con actividad contra SAMR, como son las cefalosporinas de 5ª generación (ceftobiprol, ceftarolina), así como los nuevos carbapenémicos contra SAMR (tomopenem, razupenem). Recientemente han sido emitidas las guías 2011 de la *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) para el manejo apropiado del SAMR tanto en adultos como en niños, en donde se contemplan nuevas alternativas como linezolid, daptomicina, entre otras.<sup>6</sup>

**3. Resistencia a vancomicina.** Los glucopéptidos, particularmente la vancomicina, han sido durante las últimas 5 décadas, el tratamiento de elección para aquellas cepas de SAMR. Desde 1997 se documentó en Japón la susceptibilidad reducida a vancomicina, pero no fue hasta el año 2002 que apareció la primera cepa de *S. aureus* resistente a la vancomicina (SARV) en los E.U.A. Hasta la fecha, se han documentado 9 cepas de SARV en ese país (7 de ellas en Michigan); y 2 cepas adicionales, provenientes de Irán e India, que están aún por confirmarse.<sup>7</sup> La resistencia a vancomicina en el SARV se ha adquirido de los *Enterococcus* spp.,

a través de un plásmido de conjugación que porta un transposon (Tn1546) y que contiene el operon VanA, el cual se compone por los genes VanA, VanH, VanX, VanS, VanR, VanY y VanZ, los cuales generan que el dipéptido terminal de los precursores de peptoglicano, en lugar de terminar d-Ala-d-Ala, termine en d-Ala-d-Lac, lo que disminuye la afinidad de los glucopéptidos, interfiriendo así en su sitio de acción, frenando la síntesis de la pared bacteriana.<sup>8-10</sup> Esta resistencia tipo VanA, genera resistencia tanto a teicoplanina como a vancomicina, siendo de alta resistencia para ésta última. EL SARV se define cuando los CIM's son  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ . Si bien el SARV es poco frecuente a nivel mundial, los que sí son mucho más prevalentes y que debe alertarnos para su identificación, son los denominados *S. aureus* con susceptibilidad intermedia a vancomicina (VISA), que presentan CIM's entre 4-8  $\mu\text{g/mL}$  y aquellas poblaciones heterogéneas de VISA (hVISA) con CIM's entre 1-2  $\mu\text{g/mL}$  (contando con subpoblaciones que pueden crecer a 4  $\text{mg/mL}$ ). Tanto el VISA como hVISA tienen un mecanismo de resistencia completamente diferente al expresado por el SARV.<sup>9</sup> Los VISA/hVISA adquieren la resistencia a través de un proceso de adaptación gradual en el que la pared bacteriana se engrosa progresivamente, hasta dificultar el paso del glucopéptido a través de la misma; adicional a ello, se ha documentado una disminución en la degradación autolítica. La prevalencia de hVISA se reporta desde un 0-74%, dependiendo del área geográfica, sin embargo, la mayoría de reportes muestran una prevalencia entre 5-15%.<sup>10</sup> Se sabe que estas cepas tendrán una pobre respuesta al tratamiento con glucopéptidos, por lo que su detección oportuna es fundamental para iniciar un correcto manejo antimicrobiano (ej. linezolid, QP/DP, TMP/SMX, daptomicina). Si bien no existe un método estandarizado para la detección de hVISA, lo más recomendado es la prueba de Etest, la cual se considera positiva (resistente) cuando se obtiene una zona de inhibición de  $>8$   $\mu\text{g/mL}$  para vancomicina y teicoplanina, o bien de  $\geq 12$   $\mu\text{g/mL}$  solamente para la teicoplanina. Los laboratorios de microbiología deben estar sensibilizados para la detección de dichas resistencias.<sup>10</sup>

## Tipificación Molecular

La necesidad de conocer la evolución y la distribución de las diferentes tipos de cepas de *S. aureus*, ha permitido el desarrollo y la estandarización de diversas metodologías para realizar la tipificación molecular de *S. aureus*. Entre los métodos más comúnmente utilizados se encuentran:

1. La electroforesis de campos pulsados (**PFGE**) permite su clasificación según el análisis de fragmentos generados por la enzima de restricción *SmaI*. La CDC ha desarrollado un protocolo estandarizado para su proceso y una nomenclatura denominada "USA" que permite clasificar los diferentes patrones electroforéticos generados (ej. USA100, USA300, USA400, etc.).<sup>11-13</sup>

2. El **MLST** (Multilocus Sequence Typing) permite la tipificación basándose en el análisis de 7 secuencias derivadas de las variaciones alélicas de 7 genes conservados (*arc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqi*), lo cual genera un perfil alélico (denominado ST=Secuencia Tipo) específico para cada aislamiento bacteriano.<sup>13</sup> Este método es altamente reproducible, además de que se cuenta con una base de secuencias en Internet, donde el usuario puede subir y comparar sus secuencias tipo y complejos clonales (<http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>).

3. La tipificación **spa**, a diferencia del MLST, es un estudio monolocus, que consiste en el análisis de secuencias de repetición variable (VNTR) localizadas en el gen de la proteína del *S. aureus* (*spa*). La discriminación se efectúa según las diferentes mutaciones puntuales que se presentan en estas regiones de dicho gen.<sup>14</sup>

4. La tipificación **SCCmec**, permite la diferenciación de clonas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina. Como se comentó, el cassette cromosómico de *S. aureus* contiene el gen *mecA*, los complejos genéticos *ccrA*, *ccrB* y *ccrC*, genes reguladores y secuencias de inserción, de manera que las mutaciones que se presenten en cualquiera de estas regiones, ofrecerán patrones diferentes.<sup>15</sup> Esta metodología no suele utilizarse en forma primaria, sino para diferenciar clonas y cepas estrechamente relacionadas previamente clasificadas por PFGE y/o MLST.

## Métodos diagnósticos para documentar resistencia a la meticilina

Para la determinación de resistencia a la meticilina del *S. aureus*, el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), actualmente recomienda el método de difusión en disco de cefoxitina (30  $\mu\text{g}$ ); cuando se obtienen halos de inhibición  $\leq 19$  mm se consideran resistentes y con halos  $\geq 20$  mm se consideran susceptibles. Sin embargo ésta metodología toma entre 3-5 días para ofrecer resultados finales. Actualmente diversos métodos de identificación más rápidos han surgido con la

finalidad de tomar decisiones terapéuticas inmediatas, así como optimizar las medidas de aislamiento y control de infecciones a nivel hospitalario. Métodos basados en agares cromogénicos, acortan el tiempo de detección, permitiendo resultados a las 24-48 horas, sin embargo, esta demora es aún inaceptable para algunos escenarios clínicos en donde lo idóneo es tener resultados en al menos un par de horas. Por ello, los métodos moleculares surgen como excelentes alternativas cuando se requieren resultados rápidos y confiables. Numerosas plataformas y kits han surgido para resolver este problema.<sup>16,17</sup> Lo que es importante mencionar, es que cualquiera que sea la metodología molecular utilizada, debe de detectar el gen *mecA*, inmerso en los diversos *SCCmec*; adicional a ello, es importante que la tecnología a utilizar, permita diferenciar que el gen *mecA* detectado sea parte de un *S. aureus*

y no de alguno de los *Staphylococcus* coagulasa negativos, ya que éstos últimos también portan los mismos *SCCmec*. Para resolver estos posibles falsos positivos, el grupo de Huletsky A., y Bergeron MG., desarrollaron una metodología que permite detectar el gen *orfX*, que es específico de *S. aureus* y el cual se encuentra contiguo al *mecA*, permitiendo así, que la amplificación abarque ambas regiones<sup>18</sup>, evitando resultados falsos positivos. Esta metodología incluso ha sido llevada a plataformas y kits comerciales, que son completamente automatizados, y que permiten la identificación de SAMR en menos de 2 horas en muestras clínicas diversas.<sup>19</sup> Esto es apenas, uno de los asombrosos avances en los que las herramientas moleculares diagnósticas son llevadas directamente al campo clínico, en donde los resultados precisos y oportunos nos permiten generar un gran impacto en la atención de los pacientes.

#### Referencias

1. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010;67:3057-3071.
2. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 2008;46 Suppl 5:S350-9.
3. Bubeck Wardenburg J, Patel RJ, Schneewind O. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun* 2007; 75:1040-1044.
4. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68(5):981-1003.
5. Matouskova I, Janout V. Current knowledge of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008;152(2):191-202.
6. DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2464-74.
7. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, J Rybak M, Talan DA, Chambers HF. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis.* 2011;52(3):18-55.
8. Périchon B, Courvalin P. VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4580-4587.
9. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev.* 2010;1(23):99-139.
10. Rong SL, Leonard SN. Heterogeneous Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*: A Review of Epidemiology, Diagnosis, and Clinical Significance. *Ann Pharmacother* 2010;44:844-50.
11. [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/ar\\_mras\\_PFGE\\_s\\_aureus.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/ar_mras_PFGE_s_aureus.pdf)
12. McDougal LK, et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5113-5120.
13. Mark C. Enright, Nicholas P. J. Day, Catrin E. Davies, Sharon J. Peacock, and Brian G. Spratt. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1008-1015.
14. Shopsis, B, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3556-3563.
15. Ito T, Kuwahara K, and Hiramatsu K. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCC mec*) analysis of MRSA. *Methods Mol Biol.* 2007;391:87-102.
16. Sturenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. *Ger Med Sci.* 2009;7:1-19.
17. Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E. Laboratory Tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:112-119.
18. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, Gagnon F, Truchon K, Bastien M, Picard FJ, van Belkum A, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):1875-84.
19. Marlow E, Wolk D. GeneXpert Testing: Applications for Clinical Microbiology, Part II. *Clin Microbiol Newsletter.* 2008;30(24):183-188.