

Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente

Maria Elena Velázquez-Meza, M en C⁽¹⁾

Velázquez-Meza ME.
Surgimiento y diseminación de
Staphylococcus aureus meticilinoresistente.
Salud Publica Mex 2005;47:381-387.

Resumen

Las infecciones nosocomiales ocasionadas por cepas de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistentes (SAMR) son un problema de salud importante en todo el mundo. Este microorganismo produce una gran variedad de infecciones incluyendo osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica y septicemia. La multirresistencia es un factor que influye en la persistencia de los SAMR dentro del ámbito hospitalario. La introducción de técnicas de tipificación molecular dentro de las investigaciones epidemiológicas ha provisto nuevas herramientas para conocer el origen y las vías de diseminación de este microorganismo. Una de las conclusiones importantes que han surgido de este tipo de estudios es que un número pequeño de clonas son las responsables de las infecciones estafilocócicas en todo el mundo.

Palabras clave: *staphylococcus*; resistencia microbiana a las drogas; resistencia a la meticilina; infección hospitalaria; epidemiología molecular

Velázquez-Meza ME.
Staphylococcus aureus methicillin-resistant:
emergence and dissemination.
Salud Publica Mex 2005;47:381-387.

Abstract

Nosocomial infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important health problem worldwide. This microorganism causes a variety of clinical infections, including osteomyelitis, invasive endocarditis, septic arthritis and septicemia. Antimicrobial resistance is a factor that influences the persistence of MRSA in the hospital environment. The introduction of molecular typing techniques in epidemiological investigations has provided new tools for identifying the microorganism's origin and routes of dissemination. One of the most important conclusions that have resulted from these types of studies is that a small number of clones are responsible for most of the staphylococcal infections throughout the world.

Keywords: *staphylococcus*; drug resistance, microbial; methicillin resistance; cross infection; epidemiology, molecular

El nombre de estafilococos fue designado por Sir Alexander Ogston después de utilizar la expresión griega *staphyle* (racimo de uvas) para describir las características de crecimiento en grupos semejantes a uvas. Los estafilococos son cocos Gram positivos que miden cerca de 1 µm de diámetro, no móviles, aéro-

bios facultativos y fermentadores de glucosa. El género *Staphylococcus* contiene más de 30 especies diferentes, y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas; no tienen otros hábitats importantes, excepto cuando están involucradas en infecciones.¹

(1) Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México.

Fecha de recibido: 11 de octubre de 2004 • Fecha de aprobado: 17 de agosto de 2005
Solicitud de sobretiros: M. en C. María Elena Velázquez Meza. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Av. Universidad 655, Col. Sta. María Ahuacatlán, 62508 Cuernavaca, Morelos, México
Correo electrónico: mevelaz@correo.insp.mx

Los estafilococos crecen en medios químicamente definidos, los cuales contienen glucosa, sales, aminoácidos, tiamina y ácido nicotínico. En medios suplementados, los estafilococos crecen bien en rangos de pH de 4.8 a 9.4 y a temperaturas de 25 a 43 °C. El color amarillo clásico de las colonias de *S. aureus* se debe a la producción de carotenoides; sin embargo, se presentan frecuentemente variantes no pigmentadas en muchas cepas.²

Actualmente *S. aureus* meticilinoresistente (MRSA) es reconocido como uno de los más importantes patógenos causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo; el surgimiento y la diseminación de cepas cada vez más virulentas y multirresistentes hace necesario hacer una revisión del tema; por ello, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Revisar el papel de *S. aureus* como comensal y patógeno humano.
2. Revisar los factores que contribuyen a la patogénesis y al incremento de la resistencia en esta bacteria.
3. Revisar los avances en estudios de epidemiología molecular del SAMR.

Comensal y patógeno humano

La elevada virulencia de *S. aureus* fue notificada por primera vez en un estudio publicado en 1941, en donde se identificó 82% de mortalidad asociada a pacientes con bacteremias ocasionadas por este microorganismo en un hospital de la ciudad de Boston.³ Las etapas de las infecciones causadas por *S. aureus* pueden resumirse de la siguiente manera: frecuentemente neonatos, niños y adultos pueden ser colonizados por *S. aureus* y portar el microorganismo generalmente en fosas nasales y, en ocasiones, en la piel y la ropa. Desde estos sitios, *S. aureus* puede transmitirse a otras regiones en la piel o a las membranas mucosas; si estas barreras son interrumpidas por un trauma o una cirugía, *S. aureus*, que es un patógeno oportunista, puede acceder al tejido provocando una lesión local. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro: infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico.^{4,5}

Factores de virulencia

El éxito de la colonización y la producción de enfermedades por *S. aureus* se debe a la expresión de facto-

res de virulencia que participan en adhesión, adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune del huésped.⁶ Los factores de virulencia se clasifican en tres categorías:⁷ (a) factores involucrados en la adherencia de la célula huésped o matriz extracelular, proteínas de unión a fibrinogeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; (b) factores involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), SEA-SEE, SEG-J, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO; la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares, tipos 1, 5 y 8; (c) factores involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, α toxina, β , γ y δ hemolisinas.⁸⁻¹⁰

S. aureus como un patógeno nosocomial

En Estados Unidos de América (EUA), *S. aureus* ocupa el segundo lugar después de los estafilococos coagulasa negativa como causa de bacteriemia adquirida en el hospital y es una causa letal y potencial en las infecciones.^{11,12} En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varía entre 5 y 70% y que los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados (50%).¹³ Con datos provenientes de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades, esta misma red reportó que en el periodo de 1997-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad. Un hospital pediátrico de tercer nivel en México, registró un franco predominio de *S. aureus* relacionado con bacteriemias nosocomiales.¹⁴ Una revisión retrospectiva de 23 años, sobre las infecciones intrahospitalarias en un hospital pediátrico en Guadalajara-México, reconoce que actualmente el género *Staphylococcus* tiene una prevalencia de 36% en esas infecciones.¹⁵ En México, diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales indicaron que de 8.3 a 36% de esas infecciones fueron atribuibles a *S. aureus*.¹⁶⁻¹⁹

Dentro de los factores que afectan el éxito de la transmisión nosocomial de *S. aureus* se encuentran los siguientes: características fenotípicas y genotípicas de las cepas, factores del huésped, esquemas de tratamiento antimicrobiano y medidas de control de las infecciones implementadas en las instituciones.²⁰ Algunas cepas de *S. aureus*, denominadas epidémicas, parecen tener la capacidad de distribuirse de manera exitosa dentro de los hospitales y causar infecciones serias en los pacientes. Los factores involucrados en la epidemividad son poco claros. Los factores que incrementan la probabilidad de adquirir *S. aureus* en hospitales incluyen: hospitalización prolongada, procedimientos

prequirúrgicos, presencia de catéteres o prótesis y la permanencia en lugares de alto riesgo: unidades de cuidados intensivos, sala de neonatos y unidades prequirúrgicas, entre otras.²¹

Resistencia antimicrobiana

La introducción de la penicilina a principios de los años 40 como tratamiento en las infecciones causadas por *S. aureus* abatió de manera importante las infecciones ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, para 1946, en Inglaterra se observó que aproximadamente 60% de los aislamientos de estafilococos fueron resistentes a penicilina, y para mediados de 1950, los aislamientos de *S. aureus* mostraron niveles más elevados de resistencia. Los primeros aislamientos clínicos de *S. aureus* multirresistentes fueron recobrados en 1957, y a principios de 1960 los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles.^{22,23}

La meticilina es un derivado semisintético de la penicilina. Esta droga fue introducida en Europa en 1959, y un año después se detectó la primera cepa de *S. aureus* meticilinorresistente; más tarde, en 1963, se reportó el primer brote nosocomial causado por SAMR; desde entonces se han notificado cepas de *S. aureus* meticilinorresistentes en todo el mundo.²⁴

El *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNIS) en EUA identificó en hospitales de tercer nivel un incremento del SAMR de 4%, en 1980, a 55%, en 2001. Para algunos hospitales se ha reportado una frecuencia de resistencia de hasta 80%.¹² En Europa, Dinamarca, Alemania y países como los escandinavos tienen una prevalencia menor a 1%, mientras que en los países del este y sureste de Europa se presentan porcentajes más elevados y que, en algunas partes, exceden 30%. Los países de Europa central tienen porcentajes de alrededor de 10%.²⁵

El fenotipo que se ha visto asociado más frecuentemente con persistencia de cepas de *S. aureus* en el hospital es el de resistencia a meticilina. La gran mayoría de los SAMR no sólo son resistentes a todos los β -lactámicos, sino también a múltiples antibióticos. Estos patrones de resistencia limitan las opciones terapéuticas contra las infecciones del SAMR; la vancomicina y la teicoplanina son las últimas alternativas terapéuticas. Sin embargo, las primeras cepas de *S. aureus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina fueron reportadas en Japón y en EUA en los años 90: a partir de entonces han aparecido más informes en la literatura.²⁶⁻²⁹

En México existe un número limitado de estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana en SAMR. En 1993, en el Hospital General de León, Guanajuato, se

identificó una resistencia global a meticilina de 24.1%.³⁰ Asimismo, en el Hospital Civil de Guadalajara, se obtuvieron resultados que indicaron un incremento en la resistencia a oxacilina en *S. aureus* de 7%, en 1989, a 20%, en 1998.³¹ Un estudio llevado a cabo entre 1998 y 1999 en un hospital de tercer nivel en México registró una frecuencia de resistencia de *S. aureus* de 14.2%.³²

Resistencia a meticilina

El elemento central de la resistencia a meticilina en *S. aureus* es la adquisición del gen *mecA*, el cual no es endógeno de esta bacteria y está integrado en el cromosoma. El gen *mecA* codifica para una proteína de unión a penicilina (PBP) de 78KDa (PBP2A), la cual presenta baja afinidad para los antibióticos β -lactámicos.³³⁻³⁶ Un estudio llevado a cabo en 1996 utilizando cepas prototipo aisladas en diferentes continentes, aportó las primeras evidencias de la existencia de tres tipos de casetes cromosomales estafilocócicos (SCC*mec* I-III).^{37,38} Recientemente, se describió un cuarto tipo (SCC*mec* IV).^{39,40} Estudios recientes indican que los tipos II y IV se encuentran circulando en cepas del SAMR en México.⁴¹

Resistencia a otros agentes antimicrobianos

El surgimiento de cepas de *S. aureus* multirresistentes representa una respuesta secuencial a la presión selectiva impuesta por la terapia antimicrobiana. Sin embargo, se ha observado que la acumulación y la diseminación de resistencia en *S. aureus* es producto del intercambio de determinantes de resistencia preexistente portados por elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones.^{42,43} El cuadro I resume los mecanismos de resistencia identificados en *S. aureus* para las clases de antibióticos más importantes.

Distribución clonal del SAMR

Los procedimientos de tipificación pueden jugar un papel importante en el diagnóstico y el manejo de las infecciones estafilocócicas; para ello en la actualidad existen diversos métodos de tipificación: serotipificación, electroforesis por multilocus enzimático, polimorfismo de fragmentos largos de restricción, ribotipificación, polimorfismos de la vecindad del gen *mecA*, electroforesis de campos pulsados y tipificación por secuencia de multilocus (MLST), pero hasta el momento ninguno de estos métodos ha sido adoptado como estándar internacional.⁴⁴⁻⁵²

La epidemiología global requiere una colección de cepas de gran tamaño representativa de todos los SAMR

Cuadro I
MECANISMOS DE RESISTENCIA IDENTIFICADOS EN *S. AUREUS*

Antimicrobiano	Blanco celular	Genes de resistencia	Mecanismo de resistencia
Amino glucósido	RNAr 30S	<i>aacA-aphD</i> , <i>aadA</i> , <i>aadD</i> , <i>aadD</i> , <i>aphA</i> , <i>aphC</i> , <i>spc</i> , <i>strA</i> .	Modificación por acetiltransferasas, adeniltransferasas o alteración ribosomal de las fosfotransferasas.
Cloranfenicol	rRNA50s	<i>cat</i>	Modificación por acetiltransferasa
Fluoroquinolonas	DNA girasa	<i>gyrA</i> / <i>gyrB</i> <i>norA</i> <i>grlA</i>	Mutaciones en los genes de la DNA girasa, Bombas de expulsión, Mutaciones en el gen de la DNA topoisomerasa IV
Fosfomicina	Síntesis del ácido N-acetil murámico	<i>fosB</i>	Modificación por una glutathione-S-transferasa
Ácido fusídico	Factor de elongación G	<i>fusA/fusB</i>	Alteración en el factor de elongación G/disminución de la permeabilidad
Glicopéptidos	Complejos D-Ala-D-Ala		Secuestro por la pared celular
Macrólidos, lincosamidas	RNAr 50s	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	Mutación del RNAr, Bombas de expulsión
Mupirocina	Isoleucil-RNAt-sintetasa	<i>mupA</i>	Producción de una isoleucil-RNAt-sintetasa modificada
Rifampicina	Subunidad β de la RNA polimerasa	<i>rif</i>	Alteraciones en la RNA polimerasa
Sulfonamidas	Síntesis de ácido tetrahidrofólico	<i>sulA</i>	Sobreproducción de ácido p-aminobenzoico
Tetraciclinas	RNAr 30s	<i>tetA(K)</i> / <i>tetA(L)</i> <i>tetA(M)</i>	Bombas de expulsión Protección ribosomal
Trimetoprim	Síntesis del ácido tetrahidrofólico	<i>dhfrA</i>	Bypass por una dehidrofolato reductasa

que circulan en diferentes áreas geográficas y en diferentes periodos. Dos esfuerzos independientes y a gran escala han sido descritos recientemente para establecer las relaciones epidemiológicas de los SAMR. El primero fue realizado por el proyecto CEM/NET Centro de Epidemiología Molecular, organizado por una red de colaboración.⁵³ El estudio incluyó aislamientos de Europa, América Latina, EUA, Japón, Taiwán, China y los primeros aislamientos del SAMR recuperados en Dinamarca e Inglaterra.^{40,47,48} Esta tipificación molecular se realizó para más de 3 000 cepas SAMR y dio como resultado la identificación de cinco clonas pandémicas: Clona Ibérica,⁵⁴⁻⁶⁰ Clona Brasileña,⁶¹⁻⁶⁶ Clona Húngara,⁶⁷⁻⁶⁹ Clona Nueva York/Japón,^{60,70,71,41} y Clona Pediátrica.^{60,64,72-76} (cuadro II).

Un segundo esfuerzo en la epidemiología global de *S. aureus* se basó en el análisis por MLST de clonas del SAMR y la creación de una base de datos central en el sitio www.mlst.net.^{77,78} La conclusión global de estos estudios fue que los SAMR tienen una estructura clonal conservada en comparación con los *S. aureus* sensibles

a meticilina, y que un número reducido de clonas cuenta con la capacidad de diseminación global (clonas del SAMR pandémicas).^{40,79}

En el año 2001 se publicaron los primeros trabajos moleculares para la determinación de las clonas del SAMR en América Latina y se encontró que la Clona Brasileña multiresistente estuvo presente en 79% de los 494 SAMR estudiados. En este mismo estudio se observó la presencia de la clona M, presente solamente en los aislamientos de México; la Clona de Brasil, predominante en Argentina, Chile y Uruguay, no se identificó en nuestro país.⁶⁵ Un estudio llevado a cabo durante un periodo de siete años, demostró la presencia de la clona del SAMR (Nueva York/Japón) circulando en aislamientos mexicanos, así como el desplazamiento durante cinco años de la clona M actual.⁴¹

Perspectivas futuras

El esclarecimiento de los factores que contribuyen a la superioridad epidémica de las clonas del SAMR pan-

Cuadro II
DISTRIBUCION DE LAS PRINCIPALES CLONAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINORRESISTENTES

Clona	País o ciudad	Año de descripción
Clona Ibérica	España, Portugal, Italia, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Francia, República Checa y EUA	1989
Clona Brasileña	Brasil, Portugal, Argentina, Uruguay, Chile y República Checa	1992
Clona Pediátrica	Portugal, Polonia, EUA y Argentina	1992
Clona Húngara	Hungría, Taiwán y China	1997
Clona Nueva York/Japón	Nueva York, Nueva Jersey, Pensilvania, Connecticut, EUA; Tokio, Japón, y México	1998

démicas, sus altos niveles de expresión de ciertos genes de virulencia y su habilidad para sobrevivir en el medio ambiente pueden ser de gran importancia para el control de los SAMR que circulan actualmente y para evitar el surgimiento de cepas con un mayor grado de resistencia y patogenicidad.

Agradecimientos

Se agradece al Programa C/PFPN-2002-35-32 PIFOP-CONACyT por la beca (176380) con la que se apoya a la autora para concluir el doctorado en Biología Experimental, en la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

Se agradece también a la M en C. Gabriela Echaniz Avilés y al Dr. Jesús Silva Sánchez, por sus comentarios sobre el presente trabajo.

Referencias

- Kloss W. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. En: Crossley KB, Archer GL, eds. The Staphylococci in human disease. Nueva York: Churchill Livingstone, 1997:113-215.
- Low DE. Clinical microbiology: issues in identification and susceptibility testing. En: Crossley KB, Archer GL, eds. The Staphylococci in human disease. Nueva York: Churchill Livingstone, 1997:233-252.
- Skinner D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. Arch Intern Med 1941;68:851-875.
- Crossley KB, Archer GL, eds. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingstone, 1997.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998;339:520-532.
- Monday SR, Bohach GA. Properties of *Staphylococcus aureus* enterotoxins and toxins shock syndrome toxin-1. Londres: Academic Press, 1999:589-610.
- Projan SJ, Novick RP. The molecular basis of pathogenicity. En: Crossley KB, Archer GL, eds. The Staphylococci in human disease. Nueva York: Churchill Livingstone, 1997:55-81.
- Jerraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougél C, et al. egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol 2001;166:669-677.
- Orwin PM, Leung DY, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infect Immun 2001;69:360-366.
- Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T et al. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. Infect Immun 2002;10:5835-5845.
- Tenover F C, Gaynes RP. The epidemiology of *Staphylococcus* infections. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2000.
- Edmond MB, Wallance SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: A three-year analysis. Clin Infect Dis 1999;29:239-244.
- Selvey LA, Whitby M, Johnson B. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: Is it any worse than nosocomial methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* bacteremia? Infect Control Hosp Epidemiol 2000;21:645-648.
- Díaz-Ramos RD, Solórzano-Santos F, Padilla-Barrón G, Miranda-Navales MG, González-Robledo R, Trejo y Pérez A. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. Salud Publica Mex 1999;41:suppl 1:S12-S17.
- Chávez PBC. Infecciones intrahospitalarias ¿Qué ha pasado durante 23 años? Enferm Infecc Microbiol Clin 2004;24:89-92.
- Molina-Gamboa JD, Garza-Moreno H. Vigilancia de infecciones nosocomiales en un hospital de cardiología. Salud Publica Mex 1999;41:suppl 1:S26-S31.
- Ponce de León S, Rangel-Frausto MS, Elías-López JL, Romero-Oliveros C, Huertas-Jiménez M. Infecciones nosocomiales: tendencias seculares de un programa de control en México. Salud Publica Mex 1999;41:suppl 1:S5-S11.
- Vargas OR, Salgado CJ. Agentes causales de neumonía nosocomial y su relación con microorganismos del ambiente hospitalario en pacientes de la unidad de cuidados intensivos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004;24:60-63.
- Camacho RR, Avila RR, López GE, Rodríguez De la Garza R, Sánchez ZM, Masud YZJ et al. Epidemiología de las infecciones nosocomiales en una unidad de terapia intensiva pediátrica. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004;24:55-59.
- Wenzel RP, Nettleman MD, Jones RN, Pfaller MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Implications for the 1990s and effective control measures. Am J Med 1991;91:221-227.
- Jensen AG, Wachmann CH, Poulsen KB, Esperse F, Scheibel J, Skinhoj P et al. Risk factor for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. Arch Intern Med 1999;159:1437-1444.
- Speller DC, Johnson AP, James D. Resistance to methicillin and others antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-1995. Lancet 1997;250:323-325.

23. Jessen O, Rosendal K, Bulow P. Changing staphylococci and staphylococcal infections: A ten year study of bacteria and cases of bacteremia. *N Engl J Med* 1999;281:627-635.
24. Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:582-586.
25. Fluid AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis* 2000;30:454-460.
26. Hiramatsu K, Hanaki H, Ito K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1998;40:135-136.
27. Hiramatsu K, Arataka N, Hanaki H. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997;350:1670-1673.
28. Centers for Disease Control. Public health dispatch: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Pennsylvania. *Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:902-903.
29. Centers for Disease Control. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin, United States. *Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:565-567.
30. Macía H, Medina V, Gaona R. Estafilococos resistentes a metilicina en un hospital general de León Guanajuato. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;3:123-127.
31. Urdez HE, Sifuentes OJ, Calva J, Villalobos ZY. Epidemiological and biological characteristics of methicillin-resistant staphylococcal infections in a Mexican Hospital. *Arch Med Res* 1999;30: 325-331.
32. Calderón-Jaimes E, Espinoza de los Monteros LE, Avila-Beltrán R. Epidemiology of drug resistance: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci infections. *Salud Publica Mex* 2002;44:108-112.
33. Archer GL, Niemeyer DM. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol* 1994;2:343-347.
34. Suzuki E, Kyoko K, Richardson JF. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1219-1226.
35. Pinho, MG, De Lencastre H, Tomasz A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10886-10891.
36. Pinho, MG, Filipe SR, De Lencastre H, Tomasz A. Complementation of essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2001;183:6525-6531.
37. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1449-1458.
38. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimota K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1323-1336.
39. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001;9:486-493.
40. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist* 2001;7:349-361.
41. Velázquez MME, Aires de Sousa M, Echaniz AG, Solorzano SF, Miranda NG, Silva SJ, De Lencastre H. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico city during a 7-year period (1997 to 2003): Clonal evolution and impact of infection control. *J Clin Microbiol* 2004;42:3877-3880.
42. Projan SJ. Antibiotic resistance in the staphylococci. En: Fischett VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, eds. *Gram-positive pathogens*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2000: 463-470.
43. Paulsen IT, Firth N, Skurray RA. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams. En: Crossley KB, Archer GL, eds. *The Staphylococci in human disease*. Nueva York: Churchill Livingstone, 1997: 158-174.
44. Arbeit RD. Laboratory procedures for epidemiology analysis. En: Crossley KB, Archer GL, eds. *The Staphylococci in human disease*. Nueva York: Churchill Livingstone, 1997: 158-174.
45. Weller TM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: Which should be international standard? *J Hosp Infect* 2000;44:160-172.
46. Musser JM, Schliever PM, Chow AV, Ewan P, Selander RK. A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 225-229.
47. Kreiswirth BJ, Kornblum RD, Arbeit W, Eisner JN, Maslow A, McGeer DE et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1993;259:227-230.
48. De Lencastre H, Couto I, Santos I, Melo CJ, Torres PA, Tomasz A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: Characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:64-73.
49. Tenover FC, Arbeit RD, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994;32: 407-415.
50. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-2239.
51. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3140-3145.
52. Spratt BG. Multilocus sequence typing: Molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:312-316.
53. Tomasz A, De Lencastre H. Molecular microbiology and epidemiology: Coexistence or alliance? In prevention and control of nosocomial infections. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997:309-321.
54. Domínguez MA, De Lencastre H, Linares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in and Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 1994;32:2081-2087.
55. Sanches I, Ramirez M, Troni H, Abecassis M, Padua M, Tomasz A, De Lencastre H. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone between Portugal and Spain. *J Clin Microbiol* 1995;33:1243-1246.
56. Mato R, Santos I, Venditti M, Platt DJ, Brown A, Cheng M, De Lencastre H. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. *Microb Drug Resist* 1998;4:107-112.
57. Witte W, Kresken M, Bräulke C, Cuny C. Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospital. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:414-422.
58. Deplano A, Witte W, Van Leeuwen WJ, Brun Y, Struelens MJ. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:239-245.
59. Melter O, Aires de Sousa M, Urbaskova P, Jakubo V, Zemlickova H, De Lencastre H. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 2003;41:4998-5005.

60. Roberts RB, De Lencastre A, Eisner W, Severina EP, Shpoin B, Kreiwit h BN, Tomasz A et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. J Infect Dis 1998;178:164-171.
61. Teixeira L, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo A, De Lencastre H et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. J Clin Microbiol 1995;33:2400-2404.
62. Aires de Sousa M, Sanches I, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T et al. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. J Clin Microbiol 1998;36:2590-2596.
63. Oliveira D, Sanches IS, Tamayo M, Ribeiro G, Mato R, Costa D et al. Virtually all MRSA infections in the largest Portuguese hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: The "Iberian" and "Brazilian" clones of MRSA. Clin Microbiol Infect 1998;4:373-384.
64. Corso A, Santos SI, Aires De Sousa M, Rossi A, De Lencastre H. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. Microb Drug Resist 1998;4:277-288.
65. Aires De Sousa M, Miragaia M, Santos I, Avila S, Adamson I, Casagrande S et al. Three year assesment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. J Clin Microbiol 2001;39:2197-2205.
66. Melter O, Santos S I, Schindler J, Aires De Sousa M, Mato R, Kovarova V et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. J Clin Microbiol 1999;37:2798-2803.
67. De Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian Hospitals. Clin Microbiol Infect 1997;3:289-296.
68. Oliveira DC, Crisóstomo I, Santos SI, Major P, Alves CR, Aires De Sousa M, et al. Comparison of DNA sequencing of the protein A gene polymorphic region with other molecular typing techniques for typing two epidemiologically diverse collections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2001;39:574-580.
69. Aires De Sousa M, Crisóstomo I, Santos SI, Wu JS, Fuzhong J, Tomasz A, De Lencastre H. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. J Clin Microbiol 2003;41:159-163.
70. Roberts RB, Chung M, De Lencastre H, Hargrave J, Tomasz A, Nicolau DP, John JF et al. Distribution of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey and Pennsylvania. Microb Drug Resist 2000;6:245-251.
71. Aires De Sousa M, De Lencastre H, Santos SI, Kikuchi K, Totsuka K, Tomasz A. Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. Microb Drug Resist 2000;6:253-258.
72. Sá-Leão R, Santos SI, Dias D, Peres I, Barros RM, De Lencastre H. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and internacional simples: Relics of a formerly widely disseminated strains? J Clin Microbiol 1999 37:1913-1920.
73. Leski T, Oliveira D, Trzcinski K, Sanches I, Aires de Sousa M, Hryniewicz W, De Lencastre H. Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. J Clin Microbiol 1998;36:3532-3539.
74. Gomes A R, Sanches I, Aires De Sousa M, Castaneda E, De Lencastre H. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: Dominance of a single unique multidrug-resistant clone. Microb Drug Resist 2001;7:23-32.
75. Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, De Lencastre H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:9865-9870.
76. De Lencastre H, Chung M, Westh H. Archaic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* molecular and micribiological properties of isolates from the 1960s in Dinmark. Microb Drug Resist 2000;6:1-10.
77. Day NP, Moore CE, Enright MC, Berendt AR, Smith JM, Murphy MF et al. A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *staphylococcus aureus*. Science 2001;292:114-116.
78. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BJ. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000;38:1008-1015.
79. Johnson AP, Aucken HM, Cavendish S, Ganner M, Wale MC, Warner M et al. Dominance of EMRSA-15 and 16 among MRSA causing nosocomial bacteraemia on the UK: Analysis of isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). J Antimicrob Chemother 2001;48:143-144.