LABORATORIO CLINICO

Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina

MONICA GIL D de M.¹

MICROBIOLOGY AND MOLECULAR FEATURES OF METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus*

Methicillin resistant strains of Staphylococci were identified immediately upon the introduction of methicillin into clinical practice. The first outbreaks of infection occurred in European hospitals in the early 1960. A chromosomal DNA "mec" gen is present in methicillin resistant strains. This mec contains mecA, the structural gene for penicillin binding protein 2a (PBP 2a) and mecI, mecR1 regulatory elements controlling mecA transcription. A distinctive feature of methicillin resistance is its heterogeneous nature, numerous genes influence in this phenotype: fem factors (A, B, C, D, E and F). The methods for detection of methicillin resistance rely on modified culture conditions to enhance the expression of resistance, use of oxacillin disk, and incubation at 30 or 35°C for 24 hours instead of 16 to 18 hours.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Methicillin resistance; MRSA; Mechanisms.

ANTECEDENTES HISTORICOS

Staphylococcus aureus es agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genitourinario.¹⁻³

Por su ubicuidad y en función de los procedimientos médicos y uso de antimicrobianos, se confiere especial énfasis al aislamiento y estudio epidemiológico de *S. aureus*, considerando su rol primordial en las infecciones nosocomiales.^{4,5}

En la década del 50 -con la introducción de

la penicilina y sulfonamidas- los estreptococos fueron desplazados por los estafilococos como agentes principales de infección intrahospitalaria. Posteriormente en los años '70, pasaron a predominar los bacilos Gram negativos, situación que revirtió con la utilización de aminoglucósidos y cefalosporinas. El uso de catéteres endovenosos y terapia inmunosupresora favorecieron la reaparición de infecciones por cocáceas Gram positivas, especialmente *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR).⁶

Así, en 1941, las infecciones estafilocócicas eran erradicadas con penicilina, pero poco des-

¹ Unidad de Microbiología Clínica, Hospital Clínico Regional de Valdivia, Chile.

pués de su introducción, Spink⁷ reportó el aislamiento de una cepa resistente por producción de β -lactamasas. Dos décadas más tarde 60% de las cepas intrahospitalarias eran ya resistentes a penicilina.

En 1959 apareció la meticilina, una penicilina semisintética, como antimicrobiano de elección para estas cepas, y en 1961 Jevons, en Londres,⁸ hizo el primer reporte de SAMR, destacándolo como importante causa de infección nosocomial en Europa.

Durante el quinquenio 1975-1980 se extendió a E.U.A. provocando graves infecciones intrahospitalarias.⁹ En 1968 Barret et al¹⁰ describieron el primer brote epidémico causado por SAMR en un hospital de Boston, el que involucró a 18 pacientes y un segundo y extensivo brote entre 1978 y 1980, que afectó a 174 pacientes.

De los años '70 en adelante, aumentó la incidencia en Irlanda¹¹ y en los inicios de la década de los '80 se extendió a Japón, reportándose en la actualidad en distintos lugares del mundo.¹²

En grandes centros médicos, SAMR es una importante causa de infección nosocomial,^{1, 2, 10, 12-14} difícil de erradicar cuando se ha introducido en los hospitales.^{15, 16} Su incidencia ha ido aumentando progresivamente, como en Inglaterra donde se elevó de 36,6% el año 1969 a 55% al año siguiente.¹⁷ Igualmente, en Zurich, de 15% en 1965 a 28,4% el año 1971,¹⁸ en Gran Bretaña de 1% en 1978 a 28% en 1983 y en España de 1-2% en 1988 a 17,8% en 1990.¹⁹

La incidencia de SAMR alcanza en la actualidad valores de 15 a 20% en Japón, 7,8% en E.U.A. y 2,6% en España;²⁰ SAMR constituye alrededor de 5 a 50% de todas las cepas de *Staphylococcus* de origen nosocomial,²¹ excediendo en algunos hospitales del 50%.¹³

En nuestro país, Ledermann et al²² detectaron las primeras cepas resistentes en 1967, reportando una frecuencia de 6,6% en 1973. Otros investigadores nacionales como Lynch,²³ García²⁴ y Silva²⁵ han encontrado una incidencia que fluctúa entre 0,8 y 4,8%.

A pesar de existir referencias de estas cepas desde el año 1967 en Chile, recién en la década del '80 comenzó a adquirir relevancia, causando entre 13,9 y 32% de las infecciones

intrahospitalarias.²⁶ Datos de 1993 muestran que 23,6% de ellas eran producidas por *S. aureus* y de éstos, 55% correspondían a SAMR. En el Hospital San Juan de Dios se confirmó la primera cepa de SAMR en julio de 1981,²⁷ alcanzó una incidencia de 1,8% del total de las infecciones estafilocócicas y se elevó a 28% en 1983 para permanecer en forma endémica hasta la actualidad.

El incremento de la prevalencia de SAMR implica un serio problema terapéutico en el ambiente hospitalario. Estos microorganismos, con sus amplios patrones de resistencia, que incluyen agentes antibacterianos de diversos grupos, han estimulado la búsqueda de tratamientos alternativos constituyendo una extensa línea de investigación en los últimos años. Por lo general, la mayoría de los SAMR presenta resistencia a otros antimicrobianos como eritromicina, tetraciclina, estreptomycin y clindamicina. Los antibióticos glicopeptídicos se han constituido en una excelente herramienta terapéutica para estas infecciones, si bien ya se han descrito cepas resistentes a vancomicina.

Mecanismos de resistencia de *Staphylococcus aureus* a antibióticos β -lactámicos

Se han descrito tres mecanismos que explican la resistencia de *S. aureus* a β -lactámicos: hiperproducción de β -lactamasa, modificación de las PBPs y resistencia intrínseca a meticilina.

No se conoce muy bien la significancia clínica de los dos primeros mecanismos, en cambio el último es el más importante y ampliamente estudiado.

- **Hiperproducción de β lactamasa o resistencia borderline** (*borderline resistant Staphylococcus aureus*- BORSA): fue descrita inicialmente por McDougal.²⁸ Su mecanismo es una hiperproducción de penicilinas estafilocócica normal, mediada por plasmidios. Estas cepas producen altas cantidades de enzima, lo que hace que oxacilina y meticilina, que fueron desarrolladas para resistir la acción hidrolítica de la penicilinas, sean lenta aunque aprecia-

blemente degradadas, presentando una resistencia límite a oxacilina con CIM de 1-2 µg/ml y meticilina con CIM de 2-4 µg/ml. Esta resistencia se encuentra avalada por la ausencia de PBP 2a en su pared celular (ver más adelante) y por la observación de que la asociación con ácido clavulánico o sulbactam disminuye las CIMs de oxacilina y meticilina en varias veces.

Las cepas hiperproductoras de β-lactamasas pertenecen casi exclusivamente al fagogrupo 94/96 y poseen un plásmido común de β-lactamasa de 17,2 Kb que codifica a la β-lactamasa estafilocócica del tipo A.²⁹ Se cree que la acción de resistencia no es sólo debida a una hiperproducción, sino también a una nueva β-lactamasa cuyo gen no se ha identificado aún.³⁰

- **Modificación de las PBPs:** descrito por Tomasz y colaboradores,³¹ corresponde a una modificación mínima (*modified S. aureus*, MODSA), de las PBPs 1, 2 y 4 de peso molecular normal pero con baja afinidad por antibióticos β-lactámicos. Al igual que el mecanismo anterior, la resistencia observada es límite.
- **Resistencia intrínseca a meticilina:** este tipo de resistencia se debe a la incorporación en el ADN bacteriano de un gen, el *mecA*. Este gen es un trozo de ADN cromosomal adicional de 30 a 50 Kb, que posee dos elementos regulatorios (*mecR1* y *mecI*) que controlan la transcripción del gen *mecA*. Posee varias características importantes de destacar:
 - Es el responsable de la inducción de la síntesis de una proteína ligadora de penicilina transpeptidasa supernumeraria: PBP 2a o PBP 2', capaz de mantener la integridad de la pared celular durante el crecimiento y la división celular cuando las enzimas habituales son inhibidas por los antibióticos β-lactámicos. Esta proteína presenta una migración electroforética entre PBP2 y PBP3, tiene un tamaño molecular de 76 KDa y se caracteriza por presentar muy baja afinidad por meticilina y todos los β-lactámicos. Experiencias experimentales muestran que las cepas sensibles a meticilina carecen de PBP2a.³¹

- La expresión del gen puede ser constitutivo o inducible.³² Se ha sugerido que *mecA* y su ADN asociado son elementos móviles,³³ probablemente los plásmidos de β-lactamasas pueden proveer un sitio de inserción temporal para el transposón que contiene el *mec*.
- Su región promotora constituida por los 300 primeros nucleótidos más los genes regulatorios, es similar en secuencia a las regiones análogas de las β-lactamasas estafilocócicas.³⁴ Los genes regulatorios, *mecI* y *mecR1* reprimen (*mecI*) o conducen (*mecR1*) la expresión del *mecA*. Las cepas de SAMR aisladas desde 1980 no tienen delecciones de genes regulatorios pero presentan polimorfismo en el *mecI* y mutaciones en el promotor *mecA*.³⁹
- Está altamente conservado entre las distintas especies del género *Staphylococcus*.
- Su origen es desconocido: todos los SAMR son descendencias clonales de las cepas ancestrales que adquirieron el gen *mec*,³⁷ desconociéndose su forma de adquisición. Probablemente fue por transposición a partir de *Staphylococcus coagulans* (-) o como consecuencia de un evento de recombinación en que se fusionaron alrededor de 300 pares de bases de un gen de β-lactamasa estafilocócica y parte de un gen que codifica para la PBP de un organismo desconocido, tal vez *E. coli*.

La región *mec* es inestable. Inglis et al⁴⁰ demostraron que la pérdida fenotípica de resistencia a meticilina bajo condiciones de laboratorio como estrés fisiológico, presencia de agentes mutagénicos (acriflavina) o subcultivos repetidos a 37°C, es debida a la delección de varios fragmentos de ADN del gen que porta la resistencia (gen *mec* o regiones vecinas).

Por estudios con enzimas de restricción se ha hecho mapeo del cromosoma que porta el gen *mec* en cepas recuperadas de hospitales y se ha observado que presentan además genes para resistencia a otros antibióticos y metales pesados como spectinomycin, macrólidos, lincosamidas, streptogramina B y meticilina (Mc). Hay transposones y secuencias de inserción presentes, incluyendo Tn 554 que contiene *erm A* (resistencia a eritromicina), localizada en 5' del *mec A*, además de TS431 en 3'

asociado a determinantes de resistencia incluyendo cadmio, mercurio y tetraciclina; así, las cepas resistentes presentan en el gen *mec*: Hg^r, Tc^r, Mc^r, Cd^r. La facilidad de recombinación homóloga para agrupar determinantes de resistencia con elementos IS similares explica esta resistencia a múltiples fármacos.

Tomasz et al.⁴¹ definieron en 1991 cuatro clases de expresión fenotípica de resistencia a meticilina en *S. aureus*: la clase 4, que es definida por una resistencia homogénea de alto nivel (CIM > 800 µg/ml) y las clases 1, 2 y 3 con resistencia heterogénea a meticilina con CIM de 1,5 a 3; 6 a 12 y 50 a 200 µg/ml, respectivamente. La mayoría de las cepas estudiadas por este autor presentaban indistintamente una CIM ≤ 20 µg/ml con gran heterogeneidad de resistencia fenotípica. Usualmente 1 en 10⁵ a 10⁶ UFC. La resistencia heterogénea es distintiva de la resistencia a meticilina⁴² en el cual 99,9% o más es sensible a bajas concentraciones de antibiótico β-lactámico y 1 en 10⁶ crece a concentraciones de meticilina de 50 µg/ml o más. Esta denominación de “heterogénea” está dada por el siguiente hecho diferencial: en placas con concentraciones elevadas y progresivas de antibiótico, el número de colonias va decreciendo inversamente a la concentración, sugiriendo que sólo una pequeña fracción de la población expresa fenotípicamente la resistencia.⁴¹

Para la detección de resistencia heterogénea se han estandarizado condiciones en el laboratorio que favorezcan su expresión como la adición de NaCl al 4%, incubación que no exceda de 35°C y se prolongue por un mínimo de 24 horas.⁴³

Los cambios en la expresión de resistencia son transitorios y enteramente fenotípicos. El pasaje de cepas heterogéneas en medio con antibióticos produce proliferación de cepas altamente resistentes, resultando en una población homogénea. Subcultivos posteriores en medio libre de antimicrobianos vuelven al *pattern* heterogéneo original.

Se desconocen diferencias entre cepas silvestres con expresión fenotípica de resistencia heterogénea u homogénea: no hay deficiencia de factores y la pared de ambas es similar. Una explicación podría ser que cepas

heterogéneas tengan alguna deficiencia en una vía bioquímica específica que repercuta en la síntesis de la pared celular, importante para el funcionamiento de la PBP 2a y que sea la presión selectiva de β-lactámicos sobre cepas homogéneas la que provoque mutaciones funcionales sobre la PBP 2a.

Factores que afectan la resistencia

- Plasmidio de β-lactamasa estafilocócica: podría impedir la delección espontánea del *mec* cromosomal⁴⁴ o podría inducir un *pattern* heterogéneo de resistencia si se inserta en receptores homogéneamente resistentes, entre otros.
- Factor *fem*: (factor esencial para la resistencia a la meticilina) o factor *aux* (auxiliar). Son genes cromosomales distintos al *mec*, necesarios para la completa expresión de resistencia, presente en cepas sensibles y resistentes. Destaca *fem A,B,C,D,E* y *F* mapeados en diferentes sitios. Mutantes *fem* alteran la composición del peptidoglicano, excepto *femE* cuya función es desconocida.⁴⁵
- Otros locus cromosomales: *//m* codifica una proteína hidrófoba de 38 Kda de función desconocida, cuya inactivación hace que una cepa de resistencia homogénea produzca un *pattern* heterogéneo de resistencia a meticilina con un aumento en la tasa de autólisis.⁴⁶ Los locus *agr* (gen accesorio regulador) y *sar* (regulador accesorio estafilocócico) están involucrados en controlar la expresión de numerosos factores de virulencia estafilocócicos y exoproteínas.

Detección de resistencia a meticilina

Dada la alta heterogeneidad (variabilidad en la expresión de resistencia) en las cepas que llevan el genotipo *mecA*, la detección de la resistencia en el laboratorio sigue siendo problemática. Las técnicas a usar deben detectar una anomalía en una población de 100.000 ó 1.000.000 de individuos, por lo que deben manejarse con precaución los factores físicos

y químicos que influyen:⁴⁷ osmolaridad del medio, luz visible (las cepas pigmentadas incubadas en la oscuridad aumentan la expresión 1,7 veces, y las cepas apigmentadas son 6.000 veces más resistente a la meticilina), pH del medio (no existiendo resistencia a un pH de 5,2 pero sí a 7,4), agentes quelantes, cationes divalentes, temperatura de incubación, presencia de antibióticos β -lactámicos, etc.

Hartzman y Tomasz⁴⁸ han sugerido la presencia de un factor adicional, producto de un gen regulador, que actuaría regulando la expresión fenotípica de la resistencia, al que inicialmente denominaron factor X. En aquellas cepas en que la expresión de la resistencia es condicionada por temperatura alta, el elemento sensible a ésta no sería en realidad la PBP2a sino el factor X cuya acción sería controlar su transducción y transcripción o tal vez, interviniendo en la regulación de la actividad autolítica o en la síntesis de la pared celular de cepas de SAMR.

Las condiciones ideales que permiten la detección en el laboratorio de cepas resistentes a oxacilina son: pH neutro, medios hipertónicos, temperatura de incubación menor a 35°C, incubaciones por al menos 24 horas, e inóculos densos.^{48, 49} Sin embargo, P. Castillo,⁴⁷ que comparó distintos métodos de detección de SAMR *in vitro*, concluyó que la variante más importante es el suplemento de NaCl 4% al medio de cultivo. Pese a los numerosos trabajos realizados, no existe en la actualidad uniformidad de criterios sobre qué modificación es la determinante principal. El factor de concentración salina pareciera ser decisivo para detectar las cepas heterorresistentes, no ejerciendo gran influencia la temperatura de incubación ni el tamaño del inóculo, a pesar que según Hackbart⁵⁰ la temperatura permite diferenciar dos tipos de cepas: *homogéneas* y *heterogéneas*. Las primeras tienen una expresión de resistencia uniforme en el 100% de la población, independientemente de la temperatura de incubación, que puede ser de 37 ó 42°C. Son cepas infrecuentes con CIM elevada. En cambio, las heterogéneas son dependientes de la temperatura, con mejor expresión a 30 que a 37°C y nula a 42°C. En este último grupo coexisten dos subpoblaciones: una más peque-

ña (1 en 10⁵ a 10⁷) detectable a 37 °C, la otra predominante y mayoritariamente termosensible, que crece a 30°C. Existe aún una mayor eficiencia al adicionar al agar Mueller Hinton NaCl 4% + 6 µg/ml de oxacilina, en condiciones estandarizadas (*oxacillin screen plate*).⁵¹ La sensibilidad de este método se aproxima al 100% para la detección de resistencia a meticilina. Otro método utilizado para la detección de SAMR es la difusión en disco, para la cual investigadores como Drew et al^{51a} recomiendan una temperatura de incubación menor a 35°C y discos de oxacilina de 1 µg o de meticilina de 5 µg. Es el método menos confiable para la detección⁵² teniendo baja especificidad. El NaCl adicionado al agar o la incubación mayor a 48 horas mejoran la sensibilidad en desventaja de la especificidad. Los resultados obtenidos son comparables al método de microdilución en caldo utilizado por Barry y Badal⁵³ para demostrar la heterorresistencia en este tipo de cepas.

El test de dilución bajo condiciones apropiadas detecta más de 95% de las cepas resistentes. El NCCLS recomienda emplear caldo Mueller Hinton suplementado con NaCl al 2% y un inóculo de 5 x 10⁵ UFC/ml y 24 horas de incubación a 35°C.⁵¹ Sólo en *Staphylococcus coagulasa* (-) es necesario prolongar a 48 horas para maximizar la sensibilidad del test.

Los sistemas automatizados tienen una excelente especificidad pero baja sensibilidad.⁵² Los resultados deberían chequearse con un segundo test como *agar screen* antes de informar la cepa como susceptible.

Como aporte al estudio epidemiológico se han desarrollado técnicas de tipificación que colaboran en la pesquisa de reservorios y vías de diseminación de SAMR. Existen técnicas fenotípicas como fagotipificación, tipificación por electroforesis de proteínas, antibiotipo, *immunoblot* y serotipificación capsular; las técnicas genotípicas se basan en la tipificación del ADN: análisis de ADN plasmidial, análisis de ADN cromosomal por enzimas de restricción, electroforesis de campo pulsado, *southern blot* y RPC.

La detección de *mec A* basada en RPC o hibridación de ADN identificará siempre correctamente la mayoría de las cepas

heterogéneas y debería ser considerado como *gold standard* para detectar la resistencia a meticilina.⁵⁴

Las técnicas genéticas para el análisis de ADN cromosomal con enzimas de restricción tienen una aplicabilidad de 100%, son reproducibles y con buen poder discriminatorio a diferencia del perfil plasmidial.⁵⁵ La gran limitación de la técnica descrita por Pitcher⁵⁵ es el gran número de fragmentos que se generan, los que pueden sobreponerse al tener pesos moleculares similares, haciendo difícil la comparación de los perfiles. Con el fin de minimizar este problema, Peterson et al⁵⁶ basaron la diferenciación de SAMR fundamentalmente en las bandas que están sobre los 8 Kb, ya que bajo este valor se ven escasas diferencias. Utilizando este análisis, la sensibilidad del método se aumenta y la constancia de los fragmentos generados la hacen muy reproducible. Según Peterson et al,⁵⁶ si sobre 8 Kb se obtienen 4 bandas de diferencia, se consideran pertenecientes a un mismo grupo y por lo tanto, estrechamente relacionados. Si la diferencia de bandas es de 5 o más, las cepas pertenecen a grupos distintos.

La presencia de SAMR en el ambiente intrahospitalario es una seria preocupación para médicos tratantes y epidemiólogos. Estudiar las bases patogénicas del microorganismo, su reservorio y la cadena infecciosa, ayudarán a evitar la selección y difusión de mutantes resistentes que dan origen al grave problema de los brotes nosocomiales.

RESUMEN

Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina fueron identificadas inmediatamente después de la introducción de este antimicrobiano en la práctica clínica. El primer brote se reportó en Europa en la década del 60, extendiéndose posteriormente a nivel mundial.

Estas cepas se caracterizan por tener un ADN cromosomal, el gen *mec*, que contiene el *mecA* (gen estructural que codifica para la PBP2a), cuya transcripción es regulada por el *mecI* y *mecR*.

La característica distintiva de la resistencia

es su naturaleza heterogénea y en su expresión fenotípica influyen numerosos genes tales como los factores *fem*.

Los métodos que permiten su detección consideran las diferentes condiciones que favorecen el incremento de la expresión de resistencia como el uso de oxacilina e incubación a una temperatura de 30 a 35° por un mínimo de 24 horas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- WALDVOGEL F A. *Staphylococcus aureus*. (Including Staphylococcal Toxic Shock) Mandell, Douglas & Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, eds. Fifth ed 2000, Churchill Livingstone, Philadelphia, Chapter 183, pp 2069-81.
- 2.- DENEGRI T A, DROQUILLY S A. Infección intrahospitalaria y contaminación por vía aérea. Rev Méd Chile 1983; 109: 1235-9.
- 3.- HERRERA V R, HENRIQUEZ M, VIDAL N. Portadores de *Staphylococcus aureus* en un servicio de cirugía. Rev Méd Chile 1984; 112: 242-6.
- 4.- EMORI T G, GAINES R P. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 428-42.
- 5.- SPINK W W, FERRIS V. Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin - resistant strains of Staphylococci. Science 1945; 102: 221.
- 6.- JEVONS M P. Celbenin-resistant Staphylococci. Br Med J 1961; 1: 124-5.
- 7.- KLIMEK J J, MARSEK F J, BARTLETT R C, WEIR B, SHEA P, QUINTILIANI R. Clinical, epidemiologic and bacteriologic observations of an outbreak of methicillin-resistant *S. aureus* at a large community hospital. Am J Med 1976; 61: 340-5.
- 8.- BARRET F F, Mc GHEE R P, FINLAND M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. NEJM 1968; 279: 441-8.
- 9.- CAFFERKEY M T, COLEMAN D, Mc GRATH B et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dublin 1974-84. Lancet 1985; 2: 705-8.
- 10.- COOKSON B, PETERS B, WEBSTER M, PHILLIPS I, NOBLE W. Staff carriage of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1989; 27: 1471-6.
- 11.- FANG F, Mc CLELLAND M. Value of molecular epidemiologic analysis in a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. JAMA 1993; 270: 1323-8.
- 12.- THOMPSON R L, CABEZUDO J, WENZEL R P. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med 1982; 97: 309-17.
- 13.- COHEN S H, MORITA M M, BRADFORD M A. Seven year experience with methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus*. Ann J Med 1991; 91 (Suppl 3B): 2335-75.
- 14.- PARKER M T, HEWITT J H. Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. Lancet 1970; 1: 800-4.
 - 15.- KAYSER F H, MAK T M. Methicillin-resistant *Staphylococci*. Am J Med Scie 1972; 264; 3: 197-205.
 - 16.- PARRAS F, RODRIGUEZ CREIXEMS M, MUÑOZ P. et al. Brote epidémico de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en un hospital general. Informe Preliminar. Enf Infect Microbiol Clin 1991; 9: 200-7.
 - 17.- PEREZ TRALLERO E, GARCIA AVENZARA J M. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a spanish hospital. Rev Infect Dis 1988; 10: 627-8.
 - 18.- BOYCE J M, WHITE R L, SPRUILL E Y. Impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the incidence of nosocomial infections. J Infect Dis 1983; 30: 148-73.
 - 19.- LEDERMANN G W, JACOB M, GONZALEZ A. Evolución de la sensibilidad del *Staphylococcus aureus* a distintas penicilinas en los últimos trece años. Bol Inst Bact Chile 1974; 16(1-2): 37-9.
 - 20.- LYNCH M B, MIMICA I, VALENZUELA M C, ABARCA S. Sensibilidad de *Staphylococcus* a 8 agentes antimicrobianos. Rev Méd Chile 1973; 101: 953.
 - 21.- GARCIA J, MALDONADO A, ROMERO H. Sensibilidad de 60 cepas de *Staphylococcus aureus* frente a 10 antibióticos. Bol Inst Salud Públ Chile 1981; 22: 60.
 - 22.- SILVA J, URDANIVIA R, HERRERA N et al. *Staphylococcus aureus* en infecciones intrahospitalarias: fagotipia y susceptibilidad a los antibióticos. Rev Chile Tecnol Méd (Santiago) 1982; 5: 129.
 - 23.- MINISTERIO DE SALUD. Informe vigilancia de infecciones intrahospitalarias a nivel de hospitales de SNSS. 1994.
 - 24.- JULIET C, FERNANDEZ A, CAMPONOVO R. *Staphylococcus aureus* multiresistentes. Rev Méd Chile 1986; 114: 123-31.
 - 25.- Mc DOUGAL L K, THORNSBERRY. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol 1986; 23: 832-9.
 - 26.- MURRAY M C, KRERNODLE D S, BARG N L. Characterization of a widespread strain of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* associated with nosocomial infections. J Infect Dis 1990; 162: 759-62.
 - 27.- MASUDA O, MONTANARI M P, MINGOIA M, VALRADO P E. Cloning and expression of the penicillinase from a borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in *Escherichia coli*. Fems Microbiol Lett 1994; 119: 263-70.
 - 28.- TOMASZ A, DRUGEN H B, DE LANCASTRE H M, JABES D, Mc DOUGALL L, BILLE J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1869-74.
 - 29.- MUSSER J, KAPUR V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: Association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. J Clin Microbiol 1992; 30: 2058-63.
 - 30.- GILLESPIE M T, LYON B R, LOO L S, MATTHEWS P R et al. Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracycline and trimethoprim resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. Fems Microbiol Lett 1987; 43: 165-71.
 - 31.- MATSUHASHI M, SONG M, ISHIMO F et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin binding protein supposed to cause high resistance to β lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1986; 167: 975-80.
 - 32.- HIRAMATSU K, KONODO N, ITO T. Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. J Infect Chemother 1996; 2: 117-29.
 - 33.- KREISWIRTH B, KORNBLUM R, ARBEIT D et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science 1993; 259: 227-30.
 - 34.- INGLIS B, EL-ADHAMI W, STEWART P. Methicillin sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* occur together among clinical isolates. J Infect Dis 1993; 167: 323-8.
 - 35.- TOMASZ A, NACHMAN S, LEAF H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of *Staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 124-9.
 - 36.- HARTMAN B, TOMASZ A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agent Chemother 1986; 29: 85-92.
 - 37.- JORGENSEN J H. Mechanism of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection. Infect Control Hosp Epidemiol 1991; 12: 14-9.
 - 38.- HIRAMATSU K, SUZUKI E, TAKAMAYO Y, KATAYAMA Y, YOKOTA T. Role of penicillinase plasmids in stability of the *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agent Chemother 1990; 34: 600-4.
 - 39.- DE LANCASTRE H, JONGE B L, MATTHEWS P R, TOMASZ A. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1994; 33: 7-24.
 - 40.- MAKI H, YAMAGUCHI T, MURAKAMI K. Cloning and characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1994; 176: 4993-5000.
 - 41.- CASTILLO P, MARTIN F. Estudio de distintos

- métodos para la detección *in vitro* de *Staphylococcus* meticilina resistentes. *Enf Infec Microbiol Clin* 1989; 7: 266-9.
- 42.- HARTMAN B J, TOMASZ A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29: 85-92.
- 43.- MARTINEZ B, LOZA F. Resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Enf Infec Microbiol Clin* 1988; 6: 61-6.
- 44.- HACKBART C, CHAMBERS H. Methicillin-resistant *Staphylococci*: Genetics and mechanism of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 991-4.
- 45.- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1990. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4th ed. Approved standard M2-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pa.
46. DREW W L, BARRY A L, O 'TOOLE R et al. Reliability of the Kirby Bauer disc diffusion method for detecting methicillin-resistant strains of *S. aureus*. *Appl Microbiol* 1972; 24: 240-7.
- 47.- CHAMBERS H F. Detection of methicillin resistance *Staphylococci*. *Infect Dis Clin North Amer* 1993; 7: 425-33.
- 48.- BARRY A L, BADAL R E. Reliability of the microdilution technique for detection of methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Am J Clin Pathol* 1977; 67: 489-95.
- 49.- TOFUE Y, SHOJI K, SATOH A, WATANABE, MOTOMIYA M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 6-9.
- 50.- PITCHER D G, SAUNDERS N A, OWEN R J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989; 8: 151-6.
- 51.- PETERSON L R, PETZEL R A, CLABOTS C R, FASCHING C E, GERDING D N. Medical technologist using molecular epidemiology as part of the infection control team. *Diag Microbiol Infect Dis* 1993; 16: 303-11.

Correspondencia a:
Mónica Gil Diez de Medina
Servicio de Farmacia
Hospital Clínico Regional Valdivia.
Av. Simpson 850- Valdivia, Décima Región, Chile
Teléfono: 56 (63) 297 318
Fono Fax: 56 (63) 293 000
Email: farmacia@uach.cl