



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA *mecA*
EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS
DESCRITAS COMO NOSOCOMIALES

DETECTION OF RESISTANCE *mecA* GENE
IN GRAM POSITIVE BACTERIA
DESCRIBED AS NOSOCOMIAL

BRISA STEFANÍA ZÚÑIGA ASTUDILLO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA
CARLOS NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE
2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA *mecA*
 EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS DESCRITAS COMO
 NOSOCOMIALES**

**DETECTION OF RESISTANCE *mecA* GENE
 IN GRAM POSITIVE BACTERIA DESCRIBED AS
 NOSOCOMIAL**

BRISA STEFANÍA ZÚÑIGA ASTUDILLO

NOTA FINAL:

Memoria para optar al Título
 Profesional de Médico Veterinario
 Departamento de Medicina Preventiva
 Animal

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS
PROFESOR CONSEJERO: M. ANTONIETA JARA OSORIO
PROFESOR CONSEJERO: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA

SANTIAGO, CHILE
2012

RESUMEN

Poco tiempo después de la introducción de un antimicrobiano al mercado ha sido posible encontrar bacterias que se muestran resistentes a su acción. Esta resistencia es de tipo natural en algunas bacterias, mientras que en otras es una condición adquirida mediante la incorporación de genes que codifican diversos mecanismos de resistencia.

Estas cepas resistentes representan un gran problema en hospitales humanos al ocasionar infecciones nosocomiales, ya que las opciones terapéuticas se ven limitadas. En medicina veterinaria, aunque las infecciones nosocomiales están en aumento, siguen siendo menos estudiadas que las adquiridas por personas. Sin embargo, estas infecciones –tanto en pacientes humanos como veterinarios– tienen en común ser ocasionadas, principalmente, por estafilococos resistentes a meticilina. Por este hecho, sumado a que *Staphylococcus aureus* meticilino resistente se transmite entre diferentes especies animales, incluyendo al hombre, es que el propósito de esta Memoria de Título fue el de detectar el gen de resistencia *mecA* en bacterias descritas como nosocomiales.

Para ello, se utilizaron tres cepas bacterianas ambientales aisladas de Hospitales Veterinarios de la Universidad de Chile y que mostraron resistencia a oxacilina: *Staphylococcus kloosii*, *Micrococcus sedentarius* y *Enterococcus faecium*. Luego de realizada la extracción del ADN, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y la electroforesis correspondientes, se obtuvieron bandas fluorescentes de aproximadamente 500 pb. Estos amplicones se enviaron a secuenciar y las secuencias obtenidas se compararon con las descritas en el GenBank® para el gen *mecA*. Los porcentajes de identidad nucleotídica de 97%, 97% y 98% respectivamente, permiten confirmar la presencia de cepas que poseen el gen *mecA* y sugiere su pronta incorporación como cepas controles positivos en futuras investigaciones.

Palabras clave: resistencia bacteriana, infección nosocomial, gen *mecA*.

ABSTRACT

Soon after the introduction of an antimicrobial on the market have been possible find resistant bacteria. This resistance is natural in some of them, but in others is an acquired condition through incorporation into the DNA of genes encoding various mechanisms of resistance.

These resistant strains represent a major problem in human hospitals as they causing nosocomial infections, because therapeutic options are limited. In veterinary medicine, although nosocomial infections are increasing, they remain less studied than those acquired by individuals. However, these infections –both in human and veterinary patients– have in common being caused, mainly by methicillin–resistant staphylococci. Due to this fact, coupled with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is transmitted between different animal species, the purpose of this Thesis is to detect the resistance *mecA* gene, known for giving multidrug resistance to bacteria that possess it.

For this, were used three bacterial strains isolated of Veterinary Hospitals of the University of Chile with resistance to oxacillin: *Staphylococcus kloosii*, *Micrococcus sedentarius* and *Enterococcus faecium*. After realized the extraction of the DNA, the technique of the polymerase chain reaction and the corresponding electroforesis, we obtained fluorescent bands of approximately 500 pb. These amplicones were sent to sequence and the obtained sequences compared with described in the GenBank for the *mecA* gene. The percentages of nucleotidic identity were 97 %, 97 % and 98 % respectively, they allow to confirm the presence of strains that possess the *mecA* gene and it suggests his prompt incorporation as positive controls in future investigations.

Keywords: bacteria resistance, nosocomial infection, *mecA* gene.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales corresponden a aquellas infecciones que son adquiridas dentro de un recinto hospitalario y cuya manifestación, dependiendo del período de incubación de la infección, puede presentarse 48 o 72 horas después, o incluso una vez dado de alta el paciente (1). Para que se produzcan, deben considerarse las características del microorganismo en cuestión, las propias del paciente y el ambiente en que éste se encuentre. Además, de llegar a producirse, lo más probable es que dicho microorganismo haya sido adquirido desde material mal desinfectado/ esterilizado o desde el mismo personal, que actúa como reservorio de muchas cepas bacterianas, siendo una de ellas, y la principal causa de infecciones nosocomiales descrita, *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SAMR) (1, 2).

Los aislados clínicos obtenidos de estos pacientes son, a menudo, resistentes a los antibióticos, especialmente a los más frecuentemente utilizados en ese hospital en particular. Es más, muchas veces estas especies se muestran como multirresistentes. De cualquier modo, ya sean infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a un tipo de antimicrobiano o a varios de ellos, el resultado será el mismo: aumento en la morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios (3).

Se considera a una bacteria resistente a los antibióticos cuando es capaz de sobrevivir enfrentada a concentraciones terapéuticas de este fármaco. Esta resistencia cobra especial importancia cuando está presente en géneros bacterianos patógenos, ya que el tratamiento de las infecciones que causen será dificultoso. De los mecanismos de resistencia bacteriana descritos –inactivación enzimática del antibiótico, modificación de la permeabilidad de la membrana bacteriana, alteración o producción de nuevos sitios blanco y presencia de bombas de eflujo– las bacterias pueden expresar uno, más de uno o todos ellos de manera simultánea (4). Además, esta característica de ser resistente a uno o más antimicrobianos es, para algunas bacterias, algo intrínseco. Lo anterior no implica necesariamente que las demás sean siempre sensibles, pues además de mutaciones cromosomales, existe la posibilidad de que una bacteria adquiera un fragmento extracromosómico de ADN –plásmidos, transposones, integrones y/ o cassettes genéticos– portador de genes que modifican la resistencia al antibiótico, a través de los procesos de transducción, transformación y/ o conjugación (5, 6).

En 1928 Alexander Fleming descubrió el primer antibiótico natural producido por el hongo *Penicillium notatum*, la penicilina, que representó un gran avance para el tratamiento de las infecciones sistémicas ocasionadas por *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, y dadas las limitaciones con que cuenta este fármaco, se han semisintetizado otros con el fin de lograr mejores resultados en los tratamientos. De allí que hoy existan penicilinas ácido-resistentes, penicilinas penicilinas-resistentes, penicilinas de amplio espectro, penicilinas activas frente a *Pseudomonas aeruginosa* y penicilinas con perfil de acción prolongado (7, 8).

El mecanismo de acción de los β -lactámicos consiste en la inhibición de la síntesis del péptidoglicano, constituyente de la pared celular bacteriana. Esta estructura está formada por fibras lineales de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, que se entrecruzan por la acción de Proteínas Ligadoras de Penicilina (PLP) para formar una pared estable. Estas proteínas se unen a las penicilinas, que tienen una estructura similar al extremo terminal del pentapéptido unido al ácido N-acetilmurámico (D-alanina-D-alanina), inactivándose irreversiblemente, con lo que la pared celular se debilita, produciéndose la lisis osmótica de la bacteria (9).

La estructura química de la penicilina tiene un anillo β -lactámico asociado a un anillo tiazolidínico de 5 átomos de carbono, formando así el ácido 6-aminopenicilánico. Al anillo β -lactámico –responsable de la actividad biológica– se encuentra unida una cadena lateral, siendo ésta la que determina las características antibacterianas y farmacocinéticas, como el espectro antibacteriano, la resistencia a penicilinasas y al medio ácido. Es esta cadena lateral la que se modifica para semisintetizar los otros antimicrobianos de este grupo (9).

Sólo los tres primeros mecanismos de resistencia mencionados anteriormente, son aplicables a los β -lactámicos, siendo la inactivación enzimática por producción de β -lactamasas el más importante. Por este motivo fue necesaria la creación de penicilinas antiestafilocócicas, como metilina y oxacilina, que resisten la acción de las β -lactamasas. Sin embargo, luego de la introducción de estos fármacos en la práctica clínica, se encontraron estafilococos metilino resistentes. En estas bacterias se había modificado el sitio blanco de los β -lactámicos (8, 10).

La PLP2 normalmente se expresa en la pared celular y tiene gran afinidad por metilina. Sin embargo, en las cepas aisladas de *S. aureus* metilina resistentes (SAMR) se encontró una variante con muy baja afinidad por este fármaco, pero que es capaz de llevar a cabo todas las funciones celulares requeridas. Esta PLP2a o PLP2' es codificada por el gen *mecA*, que forma parte de un complejo móvil (*mec*) y reside en un elemento genético denominado Cassette Cromosómico Estafilocócico en *S. aureus* (SCC*mec*). De este modo, los aislados SAMR son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos y, frecuentemente, a muchas otras clases de antimicrobianos (8, 11).

Si bien en un inicio las infecciones por SAMR se limitaban al ambiente hospitalario (SAMR-AH), hoy es posible encontrar infecciones asociadas a la comunidad (SAMR-AC), que pasaron de ser ocasionadas por los pacientes luego del alta hospitalaria, el mismo personal de atención de salud y los visitantes –que habrían actuado como vectores– a tener un origen poco claro (12).

Hasta el momento, la diferencia que se ha establecido entre ambos tipos de SAMR radica en el espectro de antimicrobianos a los que se muestran resistentes. Mientras que SAMR-AC se muestra resistente sólo a los β -lactámicos, debido a que posee el SCC*mec* tipo IV (de pequeño tamaño, por lo que sólo puede albergar el gen *mecA*), SAMR-AH –que puede poseer los tipos I, II o III de SCC*mec*– ha demostrado ser multiresistente, tanto es así, que muchas veces vancomicina es la única alternativa terapéutica. Sin embargo, ya se han reportado cepas que presentan una sensibilidad disminuida a vancomicina (11, 13).

El origen de la resistencia por parte de los estafilococos a β -lactámicos en perros y gatos no está claro, ya que, a diferencia de lo que ocurrió en medicina humana, metilina y/ o las otras penicilinas antiestafilocócicas no han sido utilizadas en ellos. Sin embargo, se debe considerar que el gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil, por lo que puede ser transferido a otras bacterias (14, 15). De este modo, *Staphylococcus pseudointermedius*, que es parte de la flora normal de la piel de los perros, pero potencialmente patógeno y zoonótico, ha demostrado tener los mismos genes de resistencia que *S. aureus* de origen humano, lo que sugiere un posible intercambio genético entre las dos especies bacterianas (16).

A pesar de que las infecciones por SAMR en animales de compañía no son frecuentes de hallar, desde que se obtuvo el primer aislado de esta bacteria en perros en el año 1994, el número de estas infecciones ha aumentado, lo que ha sido atribuido al incremento de SAMR-AC. En efecto, la transmisión de SAMR ha sido desde el ser humano a los animales de compañía, pudiendo éstos eliminar el microorganismo, infectarse o quedar como reservorio. De este modo, tanto perros como gatos, sanos y enfermos, pueden ser una nueva fuente de infección para otros animales domésticos y otras personas –como el personal veterinario que los atiende– incluyendo la reinfección a sus dueños (11, 14).

Por todo lo anteriormente descrito, el objetivo general de esta Memoria de Título fue detectar el gen de resistencia *mecA* en bacterias Gram positivas aisladas de recintos hospitalarios y descritas como nosocomiales, y los objetivos específicos detectar y secuenciar un fragmento sospechoso de ser constitutivo del gen *mecA* en estas bacterias, además de determinar el porcentaje de identidad nucleotídica del fragmento obtenido respecto de datos oficiales del GenBank®.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Muestras

Se estudiaron 3 cepas bacterianas fenotípicamente resistentes a Oxacilina, según método de difusión en placa de Kirby-Bauer, obtenidas en un trabajo anterior (17): *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus kloosii* y *Micrococcus sedentarius* (Anexo, Cuadro 1).

Detección del gen mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- 1) **Obtención del ADN bacteriano.** La extracción de ADN bacteriano se llevó a cabo mediante la utilización de un kit comercial (Genomic DNA Purification kit, Fermentas®). Desde cultivos de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml –obtenidos por turbidez comparada al tubo 0.5 de McFarland– se tomaron 200 µl, a los que se les agregó 400 µl de solución de lisis, incubándose por cinco minutos a 65° C. Luego, se agregaron 600 µl de cloroformo, mezclando suavemente y se centrifugó a 10.000 rpm durante dos

minutos (Heraeus Sepatech Biofuge®). Posteriormente, se colectó la fase superior en un tubo Eppendorf y se agregaron 800 µl de solución de precipitación, para volver a centrifugar a 10.000 rpm por dos minutos. El sedimento obtenido fue resuspendido con 100 µl de solución 1.2 M de cloruro de sodio y agitado en vórtex. A esta mezcla se agregaron 300 µl de etanol frío, para luego ser mantenida a -20° C por diez minutos. Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm por cuatro minutos, eliminando luego el sobrenadante y resuspendiendo el pellet obtenido en 100 µl de agua libre de nucleasas (Winkler®).

- 2) **Mezcla para PCR.** Se utilizó un kit (2X PCR Master Mix, Fermentas®) que contiene la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el buffer de reacción y MgCl₂, del que se extrajeron 15 µl para ser depositados en un tubo Eppendorf de 0.2 ml, junto a 5 µl de cada uno de los partidores (Anexo, Cuadro 2) y 5 µl de la muestra de ADN, obteniéndose un volumen total de 30 µl.
- 3) **Amplificación del ADN.** Se usó un termociclador Apollo, con una desnaturalización inicial a 94° C por un minuto. Posteriormente, 30 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94° C por un minuto, alineamiento a 57° C por un minuto y elongación a 72° C por dos minutos. Por último, una elongación final a 72° C por cinco minutos. Con esta metodología se obtuvo un fragmento de 533 pb (18).
- 4) **Visualización de los productos amplificados.** Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Winkler®) en buffer Tris acetato EDTA (TAE, Fermentas®). El producto de PCR se mezcló con 1 µl del producto comercial de carga, 6X MassRuler DNA Loading Dye Solution (Fermentas®), que posee glicerol –lo que otorgó densidad a la muestra– y azul de bromofenol para verificar la migración de las bandas de ADN. Una alícuota de 6 µl de esta mezcla fue depositada en el pocillo respectivo del gel. Se utilizó como marcador de tamaño molecular un estándar que contiene fragmentos de ADN que oscilan entre las 100 y 2000 pb (*HyperLadder II*, Bioline®). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 90 minutos y luego el gel fue incubado en bromuro de etidio (0.5 µg/ml) (Fermelo®) por treinta minutos y posteriormente sumergido en agua destilada por diez minutos, tras lo cual las bandas pudieron ser visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP®) y fotografiadas.

Medidas de bioseguridad

El trabajo de laboratorio se realizó acorde a los niveles de bioseguridad establecidos para el laboratorio de Microbiología, tales como uso de material estéril, delantal cerrado y guantes, en especial al manipular el gel con bromuro de etidio, además de la correcta eliminación de desechos. Dado que el proceso de visualización del producto amplificado involucró el uso de un transiluminador de luz UV, fue necesario utilizar una placa de acrílico y gafas con filtro UV. Una vez obtenida la fotografía, el gel fue incinerado.

Determinación del porcentaje de identidad nucleotídica (PIN)

Los fragmentos de ADN se enviaron al Centro de Secuenciación de Genytec Ltda. para obtener las respectivas secuencias.

Posteriormente, fueron analizadas usando el programa *on line* de libre acceso ClustalW, el cual alineó las secuencias obtenidas y permitió obtener una secuencia de consenso para cada muestra utilizada, siendo estas últimas las que se compararon con el gen *mecA* del GenBank accession number BX571856 mediante el mismo programa, lo que permitió establecer, finalmente, el porcentaje de identidad nucleotídica.

RESULTADOS

Detección y secuenciación de fragmentos sospechosos de ser constitutivos del gen *mecA*.

Las tres muestras analizadas presentaron una banda visible en el transiluminador de luz UV, las que se ubicaron alrededor del fragmento de 500 pb del marcador de tamaño molecular (Anexo, Figura 1), por lo que se enviaron a secuenciar los amplicones obtenidos.

Determinación del PIN de cada fragmento obtenido respecto del banco de datos oficial (GenBank®).

Las secuencias nucleotídicas entregadas por Genytec Ltda. fueron ingresadas a los programa *on line* de libre acceso ClustalW, que las alineó y permitió obtener las secuencias consenso (Anexo, Cuadros 3 a 5), las que, más tarde, se compararon con la secuencia del gen *mecA* que se encuentra en el banco de datos oficial (Anexo, Cuadro 6), mediante el mismo programa (Anexo, Cuadro 7), el que les otorgó PIN de entre 97% y 98% (Anexo, Cuadro 8).

DISCUSIÓN

Los seres humanos y los animales de compañía, dado el estrecho contacto que existe entre ellos, tienden a transferirse mutuamente bacterias, que pueden poseer genes de resistencia a antimicrobianos. Uno de estos genes es *mecA* que, debido a que es parte de un elemento genético móvil, se ha diseminado entre las distintas especies de estafilococos (16). Debido a la naturaleza heterogénea de expresión de este gen, muchas cepas bacterianas pueden aparecer como sensibles a β -lactámicos mediante el Método de Kirby-Bauer teniendo, sin embargo, el gen *mecA*, de allí que la detección de éste y otros genes de resistencia mediante PCR resulta de gran ayuda (10).

Al analizar los resultados obtenidos, se pudo comprobar que el procesamiento de las tres muestras fue exitoso. En este sentido, el protocolo de PCR aplicado fue adecuado, pues se generaron amplicones de aproximadamente 500 pb (Anexo, Figura 1), lo que es un buen indicio de la presencia del gen y se condice con una elección de partidores óptimos, por lo que no es necesario el diseño de nuevos (18). Sin embargo, ésto no es suficiente para asegurar la presencia de un fragmento o la totalidad de un gen en particular. Cabe mencionar que los partidores sólo reconocen una pequeña región complementaria y no todo el fragmento buscado. Es decir, la secuencia de nucleótidos que se encuentra entre los sitios de unión de los partidores podría corresponder a una secuencia inespecíficamente amplificada, por lo que es relevante conocer la secuencia nucleotídica de consenso del fragmento de 500 pb.

Es necesario destacar que no se observaron bandas inespecíficas de otros pesos moleculares al utilizar los respectivos controles negativos (ADN de virus herpes y ADNc de virus distemper), ni al utilizar agua destilada, que actúa de centinela en caso de contaminación accidental de los reactivos del PCR (Mastermix y partidores).

Malik y colaboradores en 2006 (15), compararon fragmentos del gen *mecA* de estafilococos resistentes a meticilina aislados desde perros y gatos, tanto sanos como enfermos, obteniendo idénticas secuencias nucleotídicas. Posteriormente, en el año 2009, Bemis y colaboradores (19) también compararon genes *mecA*, pero sólo de *S. pseudointermedius*, los que resultaron ser iguales entre ellos y con las secuencias disponibles en el GenBank® de *S. haemolyticus* y *S. aureus*, pero diferentes en 1 y 2

nucleótidos a las secuencias descritas en la misma base de datos para *S. pseudointermedius*. Si bien en este estudio no se consiguió un PIN de 100% entre las secuencias de consenso para cada una de las cepas, éstas no difirieron en más de un 3%, lo que sugirió que es el mismo gen en las tres cepas bacterianas (Anexo, Cuadro 8).

El alineamiento nucleotídico de las secuencias de consenso versus una secuencia almacenada en el GenBank® (20) arrojó valores altos de PIN en las tres cepas estudiadas: 97% tanto para *S. kloosii* y *M. sedentarius*, y de 98% para *E. faecium*, lo que permite confirmar que este gen es altamente conservado, tal como lo sugiere Chambers en el año 1997 (10). Si bien este alineamiento se realizó mediante el programa *on line* Clustal W, existe una alternativa de análisis: el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que enfrenta la secuencia obtenida a un panel de secuencias de una base de datos oficial. Al ingresar las secuencias obtenidas en el programa BLAST, éstas muestran una identidad nucleotídica de al menos un 97% con diversas variantes del gen *mecA*, cuyas secuencias se encuentran almacenadas en una extensa base de datos (Anexo, Cuadros 9 y 10). Así, ambos programas avalan el PIN obtenido.

Los resultados reflejan de cierta forma la realidad en medicina veterinaria, en relación a cepas participantes en infecciones nosocomiales y los genes de resistencia que poseen. Estos resultados complementan un proyecto realizado con anterioridad en el Laboratorio de Microbiología, en el que se detectaron varios genes de resistencia: *bla*_{TEM}, en caso de β-lactámicos; *tet(A)* y *tet(B)*, *tet(K)*, *tet(M)* y *tet(O)* en el caso de tetraciclinas; *vanA* y *vanB* en el caso de vancomicina y otros genes que otorgan resistencia y/ o tolerancia a biocidas (21- 24). Cabe señalar que el gen *tet(O)* no fue detectado en las cepas mantenidas por un tiempo en cepario. Esto último también ocurrió en la detección del gen *tet(A)* (22, 23).

La idea de pérdida o no detección de un gen de resistencia no es nueva, pues este fenómeno se ha descrito en el caso del gen *mecA* en aislados de estafilococos meticilino resistentes que han permanecido en cepario por algún tiempo, y que luego se utilizaron como control positivo en el PCR (25). Al considerar este fenómeno, resulta interesante disponer de más de una cepa control positiva nativa, aunque exista una cepa control positiva de origen humano –que también podría ser blanco de este fenómeno– ya que aumenta la posibilidad de contar con al menos uno de ellos cuando se requiera realizar el PCR, de allí que esta Memoria de Título tuvo como finalidad última la de encontrar al

menos una cepa bacteriana alternativa que pueda ser utilizada como control positivo para la detección de este gen en investigaciones futuras.

Finalmente, es interesante resaltar el hecho de que el gen *mecA* no ha sido descrito en cepas de *E. faecium* ni *M. sedentarius*, según la literatura consultada, lo cual resulta un hallazgo que se relaciona con la existencia de mecanismos de transferencia de material genético entre bacterias no necesariamente emparentadas, como es el caso de *E. faecium* que puede transmitir genes de resistencia a otras bacterias Gram positivas. En este sentido, se ha demostrado que el gen *vanA* –responsable de otorgar resistencia a vancomicina en enterococos– pudo ser transmitido desde cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina a cepas de *S. aureus*. Este hecho representa un grave problema en salud pública ya que, como se ha mencionado anteriormente, las opciones terapéuticas ante infecciones ocasionadas por este microorganismo multirresistente se ven aún más limitadas (11, 26)

CONCLUSIÓN

En esta Memoria de Título se logró amplificar un fragmento constitutivo del gen *mecA* en tres bacterias ambientales descritas como nosocomiales, aisladas desde hospitales veterinarios y que no difiere en más de un 3% respecto a la secuencia nucleotídica del gen disponible en el GenBank®. Así, de mediar el fenómeno de pérdida del gen *mecA*, existiría la posibilidad de usar una cepa alternativa como cepa control positivo en futuros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

1. **OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD)**. 2003. Epidemiología de las infecciones nosocomiales. Cap. 1. **In:** Prevención de las enfermedades nosocomiales: guía práctica. [En línea] <<http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/PISpanish3.pdf>> [consulta: 24-11-2010].
2. **WIELDERS, C; FLUIT, A; BRISSE, S; VERHOEF, J; SCHMITZ, F**. 2002. *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *J Clin Microbiol* 40(11): 3970-3975.
3. **JOHNSON, J**. 2002. Nosocomial infections. *Vet Clin Small Anim* 32: 1101-1126.

4. **GARZA, U.; SILVA, J.; MARTÍNEZ, E.** 2009. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Publica Mex* 5 (3): 439-446.
5. **CABRERA, C.; GÓMEZ, R.; ZÚÑIGA, A.** 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med* 38: 149-158.
6. **GONZÁLEZ, G.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.** 2004. Integrones y *cassettes* genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antimicrobianos. *Rev Méd Chile* 132: 619-626.
7. **ERRECALDE, J.** 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencia en la salud pública. [En línea] <<http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm>> [consulta: 03-11-2010].
8. **MARTÍN, T.** 2002. Antimicrobianos que actúan en la pared bacteriana. **In:** Botana, L.; Landoni, M.; Martín, T. *Farmacología y terapéutica veterinaria*. 1a Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. pp 455-467.
9. **MEDIAVILLA, A.; GARCÍA-LOBO, J.** 2004. Antibióticos β -lactámicos. **In:** Flórez, J.; Armijo, J. A.; Mediavilla, A. *Farmacología Humana*. 4ª Ed. Masson, S. A. Barcelona, España. pp. 1105-1128.
10. **CHAMBERS, H.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10(4): 781-791.
11. **WEESE, J.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. *J Am Anim Hosp Assoc* 41(3): 150-157.
12. **NOTARIO, R.; LEJONA, S.; MÉNDEZ, E.; ALL, L.; LASCIALANDARE, S.; BORDA, N.** 2007. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* metilino resistentes adquiridos en la comunidad (SAMR-AC), en Rosario y Santa Fe. *Rev. Méd. Rosario* 73: 82-85.
13. **SAÏD-SALIM, B.; MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infection Control and hospital Epidemiology* 24(6): 451-455.
14. **GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.** 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(2): 321-332.
15. **MALIK, S.; PENG, H.; BARTON, M.** 2006. Partial nucleotide sequencing of the *mecA* genes of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs. *J Clin Microbiol* 44(2): 413-416.
16. **GUARDABASSI, L.; LOEBER, M.; JACOBSON, A.** 2004. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Vet Microbiol* 98(1): 23-27.
17. **AVENDAÑO, P.** 2010. Identificación y estudio de sensibilidad antimicrobiana de bacterias nosocomiales aisladas de recintos hospitalarios veterinarios de la

Universidad de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 54 p.

18. **WICHELHAUS, T.; KERN, S.; SCHÄFER, V.; BRADE, V.** 1999. Rapid Detection of Epidemic Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 37(3): 690-693.
19. **BEMIS, D.; JONES, R.; FRANK, L.; KANIA, S.** 2009. Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from dogs. *J Vet Diagn Invest* 21: 53-58.
20. **HOLDEN, M.; FELL, E.; LINDSAY, J.; PEACOCK, S.; DAY, N.; ENRIGHT, M.; FOSTER, T.; MOORE, C.; HURST, L.; ATKIN, R.; BARRON, A.; BASON, N.; BENTLEY, S.; CHILLINGWORTH, C.; CHILLINGWORTH, T.; CHURCHER, T.; CLARK, L.; CORTON, C.; CRONIN, A.; DOGGETT, J.; DOWD, L.; FELTWELL, T.; HANCE, Z.; HARRIS, B.; HAUSER, H.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; JAMES, K.; LENNARD, N.; LINE, A.; MAYES, R.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; ORMOND, D.; QUALL, M.; RABBINOWITSCH, E.; RUTHERFORD, K.; SANDERS, M.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; STEVENS, K.; WHITEHEAD S.; BARRELL, B.; SPRATT, B.; PARKHILL, J.** 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 101: 9786-9791.
21. **CÉSPEDES, P.** 2009. Detección de genes de resistencia a biocidas en bacterias nosocomiales mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 60 p.
22. **GALARCE, N.** 2011. Detección de tres genes de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde gatos. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 60 p.
23. **OBREQUE, B.** 2011. Obtención de controles positivos en la detección de dos genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias de interés veterinario. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 21 p.
24. **YÁÑEZ, D.** 2011. Detección del gen de resistencia *bla*_{TEM} en bacterias descritas como nosocomiales. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 18 p.
25. **VAN GRIETHUYSEN, A.; VAN LOO, I.; VAN BELKUM, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; WANNET, W.; VAN KEULEN, P.; KLUYTMANS, J.** 2005. Loss of the *mecA* gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 43(3): 1361-1365.
26. **RAJA, N.; KARUNAKARAN, R.; NGEOW, Y.; AWANG, R.** 2005. Community-acquired vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a case report from Malaysia. *Journal of Medical Microbiology* 54: 901-903.

ANEXO

Cuadro 1: Muestras según especie bacteriana y resistencia a oxacilina.

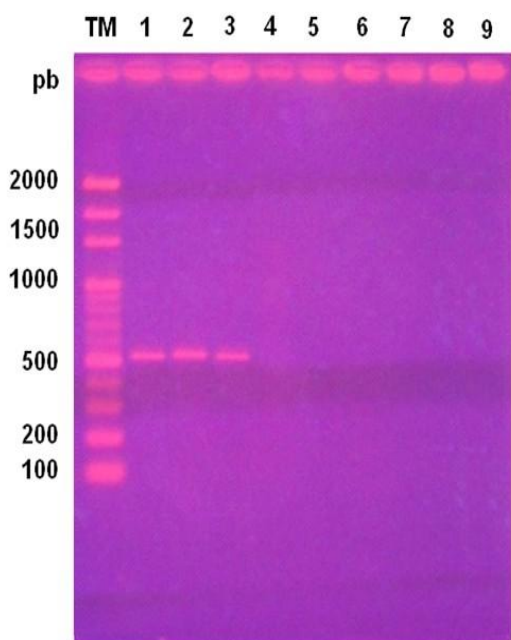
N°	Especie	Gram	Ox
59	<i>Enterococcus faecium</i>	(+)	R
67	<i>Staphylococcus kloosii</i>	(+)	R
46	<i>Micrococcus sedentarius</i>	(+)	R

Ox: Oxacilina; R: Resistentes.

Cuadro 2: Partidores utilizados según Wichelhaus *et al.*, 1999.

5'- AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C -3'
5'- AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C -3'

Figura 1. Detección del gen *mecA* en 3 cepas de bacterias descritas como nosocomiales.



Carril	Contenido
TM	HyperLadder II. 100-2000 pb
1	ADN <i>S. kloosii</i>
2	ADN <i>E. faecium</i>
3	ADN <i>M. sedentarius</i>
4	ADN Virus herpes felino
5	ADN Virus herpes canino
6	ADNc Virus Distemper
7	H ₂ O destilada
8, 9	Sin muestra

Cuadro 3. Obtención de secuencia de consenso BSZA1: *mecA* de *Staphylococcus kloosii*.

```

ST1      GATTAAGGTGGCAAAAAGATAAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGG 50
ST2      -----AAGCCTGTATTTCCGGATAGGTTCAACGTTACAAGATATGAAGTGG 46
          ** * ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ST1      TAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTA 120
ST2      TAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTA 106
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ST1      GAGTAGCACTC-GAATTAGGCAGTAAGAAATTT-GAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGT 178
ST2      GAGTAGCACTTTGAATTAGGCAGTAAGAAATTTTCGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGT 166
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ST1      TGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAATTT 238
ST2      TGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAATTT 226
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ST1      AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCC 298
ST2      AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCC 286
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ST1      AGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCA 358
ST2      AGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCA 346
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ST1      CTGATTAAAAGACACGAAAAACAAATATAAGGAAGAAAAATATTATTTCAAAGAAAATA 418
ST2      CTTATTAAAAGACACGAAAAACAAA-GTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCAAAGAAAATA 405
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ST1      TCAATCTATTAAGTATGCAACAAGTCGTAATAAAAACACATAAAGAAGATATTT 478
ST2      TCAATCTATTAAGTATGCAACAAGTCGTAATAAAAACACATAAAGAAGATATTT 465
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ST1      ATAGATGCATATGAGATACTAAATT----- 503
ST2      ATAGAT-CTTATGCAA-ACTTAATTGGCAAATCCGA 499
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

Secuencia de consenso:

>BSZA1

AAAGATAAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAA
TCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTTTGAATTAGGCAGTAAGAAATTTTCGAAAAAGGCATGAAAAAACTAG
GTGTTGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAATTTAGATAATGAAATATTAT
TAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATA
ATGGCAATATTAACGCACCTCACTGATTAAGACACGAAAAACAAATATAAGGAAGAAAAATATTATTTCAAAGAAAAT
ATCAATCTATTAAGTATGCAACAAGTCGTAATAAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATGCATATGAGATACT
AAATT

Cuadro 4. Obtención de secuencia de consenso BSZA2: *mecA* de *Micrococcus sedentarius*.

```

MS1      TAAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGGGTGGT-TACAACGTTACAAGATATGAAGTGG 59
MS2      -----AAGAGCACATCCCGCGGGCCATGTTCAACGTTACAAGATATGAAGTGG 48
          **      * *** * *** * * *****

MS1      TAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTA 119
MS2      TAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTA 108
          *****

MS1      GAGTAGCACTC-GAATTAGGCAGTAAGAAATTT-GAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGT 177
MS2      GAGTAGCACTTTGAATTAGGCAGTAAGAAATTTTCGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGT 168
          *****

MS1      TGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAATTT 237
MS2      TGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAATTT 228
          *****

MS1      AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCC 297
MS2      AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCC 288
          *****

MS1      AGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCA 357
MS2      AGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCA 348
          *****

MS1      CTGGTTAAAAGACACGAAAAACAAAATAAGGAAGAAAATATTATTTCCAAAGAAAATAT 417
MS2      CTTATTTAAAAGACACGAAAAACAAAGTTTGAAGAAAATATTATTTCCAAAGAAAATAT 408
          ** ***** * *****

MS1      CAATCTATTAAGTATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTA 477
MS2      CAATCTATTAAGTATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTA 468
          *****

MS1      TAGATGCATATGAAAATAAG----- 498
MS2      TAGAT-CTTATGCAACTTAATTGGCAAATCCGTGC 502
          ***** * ***** ** ***
    
```

Secuencia de consenso:

>BSZA2

```

AAAGATAAATCTTGGGGTGGTGTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAG
AATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTTTGAATTAGGCAGTAAGAAATTTTCGAAAAAGGCATGAAAAAACT
AGGTGTTGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAATTTAGATAATGAAATATT
ATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAA
TAATGGCAATATTAACGCACCTCACTGGTTAAAAGACACGAAAAACAAAATAAGGAAGAAAATATTATTTCCAAAGAAA
TATCAATCTATTAAGTATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATGCATATGAAAATA
AAG
    
```

Cuadro 5. Obtención de secuencia de consenso BSZA3: *mecA* de *Enterococcus faecium*.

```

EF1      -GGTTGGCAAAAAGATAAAATCTTGGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAA 59
EF2      AGGTTGGCAAAAAGATAAAATCTTGGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAA 60
          *****

EF1      ATGGTAATATCGACTTAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAG 119
EF2      ATGGTAATATCGACTTAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAG 120
          *****

EF1      TAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTG 179
EF2      TAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTG 180
          *****

EF1      AAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGTCTCAATTTCAAACAAAAATTTAGATA 239
EF2      AAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGTCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATA 240
          *****

EF1      ATGAAATATTATTAGCTGATTC--AGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGT 297
EF2      ATGAAATATTATTAGCTGATTCGAGGT--CGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGT 298
          *****

EF1      ACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTG 357
EF2      ACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTG 358
          *****

EF1      ATTAAAAGACACGAAAAACAAAAATAAGGAAGAAAAATATTATTTCAAAGAAAATATCA 417
EF2      ATTAAAAGACACGAAAAACAAAAATAAGGAAGAAAAATATTATTTCAAAGAAAATATCA 418
          *****

EF1      ATCTATTAAGTATGGTATGCAAGTAGTCGTAATAAAAACACATAAAGAAGATATTTATA 477
EF2      ATCTATTAAGTATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAAACACATAAAGAAGATATTTATA 478
          *****

EF1      GATACATATGAAAGACTGATTAG 500
EF2      GATACATATGAAAGACTGT---- 497
          *****

```

Secuencia de consenso:

>BSZA3

```

GGTTGGCAAAAAGATAAAATCTTGGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAACA
AGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAA
AAAAC TAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGTCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGA
AATATTATTAGCTGATTCTGAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCA
TTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTGATTAAGAAGACACGAAAAACAAAAATAAGGAAGAAAAATATTATTT
CAAAGAAAATATCAATCTATTAAGTATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATACAT
ATGAAAGACTGA

```

Cuadro 6. Secuencia descrita del gen *mecA* en GenBank®: *Staphylococcus aureus* MRSA252.

>MRSA252
 ATGAAAAAGATAAAAAATGTTCCACTTATTTTAATAGTTGTAGTTGTCGGGTTTGGTATATATTTTTATGCTTCAAAGAT
 AAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAA
 AGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCGGATAAAAAATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAG
 GATCGTAAAAATAAAAAAGTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAAAATAAAACAACTACGGTAACATT
 GATCGCACAGTTCAATTTAATTTTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCAGGA
 ATGCAGAAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAATCAGAACGTTGGTAAAATTTAGACCGAAACAATGTGGAAATG
 GCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAA
 CTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAATGGATCAAATTTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAACC
 GTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTTCGCAAAAAATTTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACAT
 CCTCTAGGAAAAGCGACTTCACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACCTCTGAAGAATTAACAAAAAGAATATAAA
 GGCTATAAAGATGATGACGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTAT
 CGTGTCACAATCGTTGACGATAAATAGCAATAACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAAGATGGCAAGATATT
 CAACTAATATTGATGCTAAAGTTCAAAAGAGTATTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTACTGCTATCCAC
 CCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAA
 GAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACCTCCAGGTTCAACTCAA
 AAAATATAACAGCAATGATTGGGTTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGG
 CAAAAGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATA
 GAATCATCAGATAACATTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAACTA
 GGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTA
 TTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAA
 AATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGACACGAAAAACAAGTTTGGAGAAAAATATTTATTTCCAAAGAAAA
 ATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTA
 ATTGGCAAAATCCGGTACTGCAGAACTCAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATTTGGGTGGTTTATATCATATGAT
 AAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAATC
 TCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAA

Cuadro 7. Alineamiento de las secuencias BSZA1, BSZA2, BSZA3 y MRSA252 (GenBank®).

BSZA3	-----GTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGGGGTG-	29
MRSA252	GATAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGGG-TG-	1318
BSZA1	-----AAAGATAAATCTTGGGG-TG-	19
BSZA2	-----AAAGATAAATCTTGGGGGTG-	20
	***** **	
BSZA3	GT-TACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAAATATCGACTTAAAACAAGCAATA	88
MRSA252	GT-TACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAAATATCGACTTAAAACAAGCAATA	1377
BSZA1	GT-TACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAAATATCGACTTAAAACAAGCAATA	78
BSZA2	GTGTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAAATATCGACTTAAAACAAGCAATA	80
	** *****	
BSZA3	GAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTC-GAATTAGGCAGTAAGAAAT	147
MRSA252	GAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTC-GAATTAGGCAGTAAGAAAT	1436
BSZA1	GAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTTTGAATTAGGCAGTAAGAAAT	138
BSZA2	GAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTTTGAATTAGGCAGTAAGAAAT	140
	***** *****	
BSZA3	T-GAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTT	206
MRSA252	T-GAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTT	1495
BSZA1	TCGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTT	198
BSZA2	TCGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTT	200
	* *****	

```

BSZA3      ATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCTGAGG 266
MRSA252    ATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTC--AGG 1553
BSZA1      ATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTC--AGG 256
BSZA2      ATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTC--AGG 258
*****

BSZA3      TTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATT 326
MRSA252    TTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATT 1613
BSZA1      TTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATT 316
BSZA2      TTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATT 318
*****

BSZA3      AGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTGATTTAAAAGACACGAAAAACAAAATAA 386
MRSA252    AGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTTAAAAGACACGAAAAACAAAG-TTT 1672
BSZA1      AGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTGATTTAAAAGACACGAAAAACAAATATA 376
BSZA2      AGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTGGTTAAAAGACACGAAAAACAAA-ATAA 377
*****

BSZA3      GGAAGAAAAATATTATTT--CCAAAGAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACA 444
MRSA252    GGAAGAAAAATATTATTT--CCAAAGAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACA 1730
BSZA1      GGAAGAAAAATATTATTT--CCAAAGAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACA 434
BSZA2      GGAAGAAAAATATTATTT--CCAAAGAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACA 435
*****

BSZA3      AGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATA----- 483
MRSA252    AGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACCTTAATTGGCAA 1790
BSZA1      AGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATG----- 473
BSZA2      AGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATG----- 474
*****

```

Cuadro 8. Porcentajes de identidad nucleotídica (PIN) de secuencias en estudio v/s GenBank®.

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	BSZA1	491	2	BSZA2	489	98.0
1	BSZA1	491	3	BSZA3	498	97.0
1	BSZA1	491	5	MRSA252	2007	97.0
2	BSZA2	489	3	BSZA3	498	98.0
2	BSZA2	489	5	MRSA252	2007	97.0
3	BSZA3	498	5	MRSA252	2007	98.0

Cuadro 9. Secuencia BSZA1 versus diversas variantes de *mecA*, según BLAST.

Sequences producing significant alignments:					
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
JF778650.1	Staphylococcus aureus strain AKLMRSA80 penicillin binding protein	826	826	97%	97%
AB512767.1	Staphylococcus aureus DNA, type V staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
AB505630.1	Staphylococcus aureus DNA, type X (1C1) staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
AB505629.1	Staphylococcus aureus DNA, type V (585C2) staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
AB505628.1	Staphylococcus aureus DNA, type IX (1C2) staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
CP002643.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus T0131, complete genome	826	826	97%	97%
FR753166.1	Staphylococcus aureus ACME and SCCmec composite islands, complete	826	826	97%	97%
GU370073.2	Staphylococcus cohnii strain WC28 SCCmec cassette, complete	826	826	97%	97%
HM030721.1	Staphylococcus aureus strain M299 mec type IV staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
HM030720.1	Staphylococcus aureus strain M1 mec type IV staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
CP002110.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus TCH60, complete genome	826	826	97%	97%
CP001844.2	Staphylococcus aureus 04-02981, complete genome	826	826	97%	97%
GO918137.1	Staphylococcus aureus strain WKZ-2 SCCmec element, complete	826	826	97%	97%
CP002114.2	Staphylococcus aureus subsp. aureus JKD6159, complete genome	826	826	97%	97%
CP002120.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus str. JKD6008, complete genome	826	826	97%	97%
AB546266.1	Staphylococcus fleurettii DNA, methicillin-resistance gene region	826	826	97%	97%
GU451307.1	Staphylococcus epidermidis strain BCB-F63 SCCmec type IVA element	826	826	97%	97%
GU451306.1	Staphylococcus epidermidis strain BCB-F57 SCCmec type IVA element	826	826	97%	97%
GU451305.1	Staphylococcus epidermidis strain BCB-F1 SCCmec type IVA element	826	826	97%	97%
AB539727.1	Staphylococcus aureus DNA, cassette chromosome mec (SCCmec)	826	826	97%	97%
GO902038.1	Staphylococcus aureus strain UMGCG-M4 OrfX (orfX) gene, partial	826	826	97%	97%
GU235984.1	Staphylococcus aureus strain BK16704 staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
GU235983.1	Staphylococcus aureus strain BK16691 staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
GU121249.1	Staphylococcus aureus strain 45394F chromosome cassettes class I	826	826	97%	97%
AM990992.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus ST398 complete genome	826	826	97%	97%
AB478780.1	Staphylococcus aureus DNA, type V staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
FN433596.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus TW20, complete genome	826	826	97%	97%
AB462393.1	Staphylococcus aureus DNA, type VII staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
AF411935.3	Staphylococcus aureus strain HDE288 type-VI SCCmec element	826	826	97%	97%
EU437549.2	Staphylococcus aureus strain cm11 SCCmec type IVA element	826	826	97%	97%
F810877.1	Staphylococcus aureus strain SC16-8 penicillin binding protein	826	826	97%	97%
F670542.1	Staphylococcus aureus strain BK20781 type VIII staphylococcal cassette class I	826	826	97%	97%
F1390057.1	Staphylococcus aureus strain MRSA C10682 conserved hypothetical	826	826	97%	97%
F1544922.1	Staphylococcus pseudintermedius strain 06-3228 SCCmec gene	826	826	97%	97%

Cuadro 10. Comparación BSZA1 versus colección nucleotídica programa *on line* BLAST.

```

>|gb|JF778650.1| Staphylococcus aureus strain AKLMRSA80 penicillin binding
protein } 2a (mecA) gene, partial cds
Length=534

Score = 826 bits (447), Expect = 0.0
Identities = 470/480 (98%), Gaps = 6/480 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAAGATAAATCTTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAAGTGGTAAATGGTAATATC 60
      |||
Sbjct 25 AAAGATAAATCTTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAAGTGGTAAATGGTAATATC 84

Query 61 GACTTAAAACAAGCAATAGAAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTTTGA 120
      |||
Sbjct 85 GACTTAAAACAAGCAATAGAAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCAC-TCGA 143

Query 121 ATTAGGCAGTAAGAAAATTTTCAAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATAC 180
      |||
Sbjct 144 ATTAGGCAGTAAGAAAATTTT-AAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATAC 202

Query 181 CAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATAT 240
      |||
Sbjct 203 CAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATAT 262

Query 241 TATTAGCTGATTCAAGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTT 300
      |||
Sbjct 263 TATTAGCTGATTCAAGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTT 322

Query 301 CAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTGATTAAGAGACA 360
      |||
Sbjct 323 CAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTGATTAAGAGACA 382

Query 361 CGAAAAACAAA-TATAAGGAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAAATATCAATCTATTAAC 419
      |||
Sbjct 383 CGAAAAACAAAAGTTT--GGAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAAATATCAATCTATTAAC 440

Query 420 TGATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATGCATATG 479
      |||
Sbjct 441 TGATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGAT-CTTATG 499
  
```