

Caracterización genotípica de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina prevalente en hospitales de Pakistán

Genotypic characterization of prevalent methicillin resistant Staphylococcus aureus in Pakistani community hospitals

Caracterização de Staphylococcus aureus resistente à meticilina prevalecente em hospitais da comunidade no Paquistão

- Zahid Majeed¹, Yasrab Arafat², Zainab Ajab¹, Salman Akbar Malik², Waseem Shehzad Abbasi², Huma Ajab¹

¹ M. Phil

² PhD

* Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

El gen de la proteína A se usó como marcador genético para la caracterización de aislados de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SAMR). De un total de 130 aislados de *Staphylococcus aureus*, 90 fueron identificados como SAMR y 81 de éstos se pudieron caracterizar por tipificación spa. Todos estos aislados fueron obtenidos de cinco Hospitales Nacionales de la Comunidad. Se utilizaron dos juegos diferentes de cebadores para amplificar la región-X del gen de la proteína A en las cepas de SAMR. Un conjunto de cebadores, spa-F/spa-R ha identificado tres tipos de repeticiones diferentes, a saber, 7 repeticiones (spa 2), 8 repeticiones (spa 3) y 10 repeticiones (spa 4) y otro conjunto de cebadores, spa-1113F/spa-1514R ha identificado 4 tipos de repeticiones diferentes, a saber, 6 repeticiones (spa 1), 15 repeticiones (spa 6), y 17 repeticiones (spa 7) y 19 repeticiones (spa 8). Se identificó la repetición 11 (spa 5) con ambos conjuntos de cebadores. Los tipos de SAMR esporádicos que portaban las repeticiones 6, 7, 10, 17 y 19 fueron poco prevalentes mientras que los SAMR epidémicos con 8, 11, y 15 repeticiones fueron más prevalentes y se los consideró involucrados en la transmisión entre los pacientes dentro de los diferentes hospitales. Este trabajo concluye que la técnica spa es lo suficientemente eficiente como para diferenciar las cepas epidémicas, esporádicas y aquéllas que se transforman lentamente de esporádicas a epidémicas.

Palabras clave: genotipo * *Staphylococcus aureus* * proteína A * tipificación spa * polimorfismo

Summary

Protein A gene was used as a genetic marker for the characterization of Pakistani methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates. Out of a total of 130 Staphylococcus aureus isolates, 90 were identified as MRSA and of these 90 MRSA, 81 MRSA isolates were characterized by spa typing. All of these isolates were collected from five National Community Hospitals. Two different sets of primers were used to amplify the X-region of Protein A gene in MRSA strains. One set of primers i.e. spa-F/spa-R identified three types of different repeats viz., 7 repeats (spa 2), 8 repeats (spa 3) and 10 repeats (spa 4) and another set of primers i.e. spa-1113F/spa-1514R identified 4 types of different repeats viz., 6 repeats (spa 1), 15 repeats (spa 6), and 17 repeats (spa 7) and 19 repeats (spa 8). Repeat 11 (spa 5) was identified with both sets of primers. Sporadic MRSA types carrying 6, 7, 10, 17 and 19 repeats were less prevalent, while the epidemic MRSA with 8, 11 and 15 repeats were more prevalent and considered to be involved in transmission among the patients within different hospitals. Research work concludes that spa technique is efficient enough to differentiate spa strains carrying variations in general and those slowly transforming from sporadic to epidemic outbreak in particular.

Keywords: *genotyping * Staphylococcus aureus * protein A * spa typing * polymorphism*

Resumo

O gene da proteína A foi usado como marcador genético para a caracterização de isolados de Staphylococcus aureus resistentes à metilina (SAMR). De um total de 130 isolados de Staphylococcus aureus, 90 foram identificados como SAMR e 81 destes puderam se caracterizar por tipificação spa. Todos estes isolados foram obtidos de cinco Hospitais Nacionais da Comunidade. Utilizaram-se dois jogos diferentes de cevadores para amplificar a região-X do gene da proteína A nas cepas de SAMR. Um conjunto de cevadores, spa-F/spa-R tem identificado três tipos de repetições diferentes, a saber, 7 repetições (spa 2), 8 repetições (spa 3) e 10 repetições (spa 4) e outro conjunto de cevadores, spa-1113F/spa-1514R tem identificado 4 tipos de repetições diferentes, a saber, 6 repetições (spa 1), 15 repetições (spa 6), e 17 repetições (spa 7) e 19 repetições (spa 8). Foi identificada a repetição 11 (spa 5) com ambos os conjuntos de cevadores. Os tipos de SAMR esporádicos que tinham as repetições 6, 7, 10, 17 e 19 foram pouco prevalentes enquanto que os SAMR epidêmicos com 8, 11, e 15 repetições foram mais prevalentes e são considerados envolvidos na transmissão entre os pacientes dentro dos diferentes hospitais. Este trabalho conclui que a técnica spa é o suficientemente eficiente como para diferenciar as cepas epidêmicas, esporádicas e aquelas que se transformam lentamente de esporádicas em epidêmicas.

Palavras chave: *genótipo * Staphylococcus aureus * proteína A * tipificação spa * polimorfismo*

Introducción

Staphylococcus aureus es uno de los agentes causales de enfermedades infecciosas humanas de distinta gravedad y frecuencia. A través de los años esta especie ha desarrollado resistencia a la metilina lo que constituye un riesgo significativo para los pacientes y suma una importante carga financiera a los recursos destinados al cuidado de la salud (1), particularmente en los países subdesarrollados, entre ellos Pakistán. Un gran número de infecciones clínicas como la foliculitis, la forunculosis, la celulitis, la mastitis, el impétigo, la osteomielitis, la endocarditis aguda y la meningitis están ligados a *S. aureus* (2). La patogénesis de *S. aureus* ha sido atribuida a su capacidad de producir una variedad de proteínas. La proteína de superficie del estafilococo conocida como proteína A, de 40-60 kD, está codificada por el gen *spa* y está presen-

te tanto en las cepas sensibles a la metilina como en las resistentes (SAMR). Esta proteína protege a la bacteria de mecanismos de defensa del huésped (3).

El gen *spa* está compuesto por aproximadamente 2.150 bp y aloja un número de regiones con funciones diferentes (Figura 1) que incluyen la región ligando Fc-de la inmunoglobulina G (IgG), la región X y la C-terminal (4). La región ligando Fc IgG está compuesta por cinco repeticiones 160 bp. La región X contiene un número variable de repeticiones de 24 bp y está ubicada inmediatamente arriba de la región que codifica la secuencia de adhesión a la pared celular de C-terminal (5) (6).

La tipificación es un prerrequisito importante de las medidas de control para los microorganismos clínicamente importantes. Hay muchas técnicas de genotipificación estandarizadas para identificar las cepas de *S. aureus* geográficamente aisladas y bien definidas. Éstas son: electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE),

electroforesis de enzimas *multilocus* (MLEE), γ -tipificación de secuencia *multilocus* (MLST), tipificación del gen coagulasa A (*coa*) y técnicas de microarreglos. En comparación con estas técnicas, la tipificación *spa* es un marcador de *locus* único para la identificación rápida de las cepas de *S. aureus* en general. La región X de la proteína A es un marcador de *locus* único que se utiliza en la tipificación *spa*. Esta tiene la ventaja de que sus datos pueden ser fácilmente comparados en todo el mundo por medio del *software* en línea *Ridom Staph Type* (7).

En Pakistán es muy escasa la literatura publicada sobre las cepas locales de SAMR. Los trabajos previos (8-13) son incompletos y no efectuaron técnicas de epidemiología molecular de SAMR que los haga clínicamente importantes. La no disponibilidad de las cepas pretipificadas, su depósito y acceso son los problemas más importantes que exhiben.

La aplicación de varias nuevas técnicas de tipificación molecular proporcionó una comprensión más minuciosa de la epidemiología y de la estructura poblacional de *S. aureus* en regiones del mundo geográficamente aisladas. En el entorno clínico, la terapia con drogas de rutina requiere la identificación exacta, rápida y a bajo costo, de los principales patógenos bacterianos. En el presente estudio se ha realizado una caracterización genotípica de SAMR en los hospitales de la comunidad pakistaníes y se presenta un análisis de los tipos *spa*.

Materiales y Métodos

MUESTRAS MRSA

De un total de 130 cepas de *Staphylococcus aureus*, 90 fueron identificadas como SAMR y de éstas se han podido caracterizar 81 por tipificación *spa*. Se recolectaron

muestras de *S. aureus* de cinco hospitales comunitarios diferentes durante el período 2007-2009. En la Tabla I se muestran los detalles del número de aislados de *S. aureus* disponibles de cada hospital. La cepa control NCTC 11561 provenía del *Army Medical College* (AMC), de Rawalpindi (13). Estas cepas se reconfirmaron por medio de pruebas bioquímicas y de sensibilidad antibiótica recomendadas. Se determinó la resistencia de *S. aureus* a la meticilina por medio del método de difusión con discos (14). Se reconocieron los aislados resistentes y sensibles en base a criterios estándares (14).

En la Tabla III se presenta la visión detallada de un número de SAMR identificados con el origen de la infección.

TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se llevaron a cabo tinción de Gram y pruebas bioquímicas de acuerdo al National Standard Method desarrollado por la Health Protection Agency, UK (<http://www.hpa-standardmethods.org/>).

EXTRACCIÓN DE ADN

Con algunas modificaciones, se adoptó el método de Japoní *et al*, para la extracción de ADN (15). Un cultivo bacteriano de 18 a 24 horas de incubación en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Oxoid, Inglaterra), se llevó a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. El cultivo fue centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 467 μ L de *buffer* Tris-EDTA. Se agregaron 30 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 3 μ L de una solución de 20 μ g/mL de proteinasa K (MB, Biochemicals Inc.). Se mezcló esta solución suavemente y se la incubó durante 1 hora a 37 °C. Se agregó un volumen igual de fenol y cloroformo (1:1) y se lo mezcló muy suavemente para evitar el cizallamiento del ADN invirtiendo el tubo hasta que las dos

Tabla I. Aislados de SAMR obtenidos en diferentes hospitales.

Fuentes	Total de aislados de <i>S. aureus</i> recibidos (n=130)	Aislados de SAMR (n=90)	Muestras clínicas
Army Medical College (AMC), Rawalpindi*	50	38	Pus, orina, esputo. Oído, líquido tisular
Pakistan Institute of Medical Science (PIMS), Islamabad*	35	25	Oído, tejido, puntas de catéter, sangre, médula espinal
Khyber Hospital, Peshawar	25	16	Pus y sangre
Kahuta Research Laboratories (KRL), Hospital, Islamabad	10	1	Orina
Federal Government Services Hospital, (FGSH), Islamabad	10	1	Sin categorizar

*Gran número de muestras clínicas se recibió de AMC y PIMS debido a su amplio programa de vigilancia de SAMR

fases se mezclaran completamente. Luego se lo hizo girar a 12.000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo. Una vez más, la fase acuosa se mezcló bien con un volumen igual de fenol y cloroformo (1:1), y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Nuevamente se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo y se le agregaron 30 µL de acetato de sodio 3M. El ADN se precipitó con 99% de etanol frío seguido por 3-4 min de centrifugado a 10.000 rpm. El sedimento de ADN se suspendió en 50 µL de *buffer* Tris-EDTA (pH 8) y se almacenó a -20 °C.

CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se determinó la concentración de ADN (ng/µL) midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. Cada muestra de ADN se diluyó 300 veces y se la cuantificó por medio de un espectrofotómetro UV (Serie 8453, Agilent, EE.UU.). El rango de longitud de onda de la absorbancia fue de 200 nm – 340 nm y se aplicó la siguiente fórmula para calcular la cantidad final de ADN en la muestra.

$$\text{ADN (ng/µL)} = [\text{DO}_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50 \times (260/280)]/180$$

CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA A

En los SAMR, la región X del gen *spa* fue amplificada con dos conjuntos de cebadores específicos para *spa*, en primer lugar, *spa* 1113F 5'-TAAAGACGATCCTTCGGT-GAGC-3', *spa* 1514R 5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTG CTT-3' y en segundo lugar *spa* F 5'- AGCACAAAAGAGGA-AGACAA-3', *spa* R 5'-GTTTAACGACATGTACTCCGT-3' (16) (17). En la alícuota de 20 µL de la reacción de PCR simple se agregaron 2 µL de *buffer* para PCR de 10X, 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 4 µL dNTPs 2 mM, 0,5 U de Taq polimerasa (5 U/µL) (MBI, Fermentas, EE.UU.), 2 µM de cebadores de 0,5 mM cada uno, 2 µL de la plantilla de ADN y 6,8 µL de ddH₂O. La amplificación por PCR de la región X en el gen *spa* se llevó a cabo con Tpersonal Thermocycler (Biometra, Alemania). El protocolo incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillado a 55 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 1 min, y extensión final a 72 °C durante 10 min. Se utilizó la cepa NCTC-11561 como control positivo para *S. aureus* y la cepa EMRSA-15 como posi-

tiva para *spa* en la PCR. Como control negativo se usó una mezcla maestra sin plantilla de ADN.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos de PCR se corrieron por electroforesis en 2% agarosa en presencia de bromuro de etidio (EtBr) en tampón 1X TBE (Tris-borato-EDTA) durante 80 min y 120 voltios. Se incluyeron ADN *ladder* de 50 bp (Fermentas, EE.UU.) y 100 bp (Pomega) en cada corrida. Se visualizaron las bandas de ADN en un transiluminador UV y se las fotografió. Se evaluaron visualmente los patrones de bandas y se los analizó por medio del *software* Quantity One (versión 4,2, Bio Rad, Alemania). Las cepas de SAMR que mostraban una banda diferenciada entre 200 bp y 600 bp se consideraron como un tipo diferente de *spa*. El número de repeticiones se determinó tal como se lo describe en la próxima sección.

CÁLCULO DE NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM

Los amplicones analizados en el gel se usaron para calcular el número de repeticiones variables en *tándem* (VNTRs) en la región X del gen *spa*. El amplicón de 263 bp contiene 9 repeticiones en la región X del gen *spa* en *S. aureus* (18). Se usó como amplicón de referencia para el cálculo de repeticiones en este estudio. En todas las muestras el número de repeticiones se calculó de acuerdo a los criterios dados más abajo.

- Tamaño de repeticiones simples en la región X = 24 bp
- Tamaño de nueve repeticiones en la región X = 24 bp x 9 repeticiones = 216 bp
- Tamaño de nueve repeticiones en la región X (18) = 263 bp
- Región extra 263 – 216 = 47 bp
- Tamaño del amplicón en este estudio = X
- Tamaño del amplicón usado para el cálculo de las repeticiones = X-47 = Y
- Número de repeticiones determinadas en las cepas de SAMR = Y/24 = R repeticiones

La Figura 1 muestra la región extra (47bp) y la región de repeticiones usada para el cálculo de número variable de repeticiones en *tándem* en la región-X amplificada del gen A de la proteína.

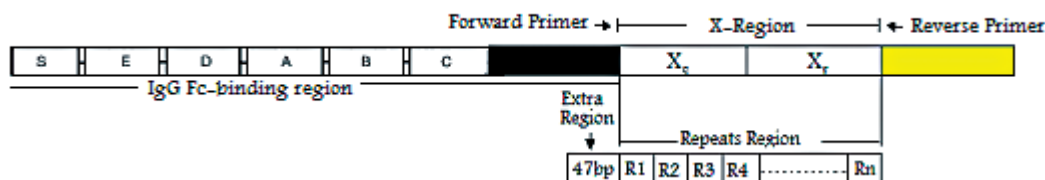


Figura 1. Mapa genético de la proteína A (23) (25). Reproducido con algunas modificaciones.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA LA TIPIFICACIÓN *spa*

Se establecieron criterios de inclusión y exclusión para la tipificación *spa*. Los cultivos puros de SAMR en los que se identificó el gen *spa*, fueron posteriormente subcultivados al menos tres veces para reconfirmarlo en términos del número de repeticiones, siguiendo los pasos mencionados anteriormente en materiales y métodos.

CRITERIOS DE DIFERENCIACION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A LA METICILINA EPIDÉMICO (SAMR-E) Y ESPORÁDICO (SAMR-S)

En este estudio, sumado al valor de corte propuesto anteriormente de 7 repeticiones (23), se han caracterizado los SAMR-E y el SAMR-S siguiendo estos criterios:

- Si el tipo *spa* específico fuera epidémico, debería estar presente en más de un hospital a partir de una importante cantidad de muestras clínicas. La recolección de más de un hospital es válida para decir que el tipo de *spa* es epidémico.
- Si la expansión del tipo *spa* estuviera limitada al interior de un solo hospital y en un número escaso de muestras de pacientes, se lo denominaría esporádico.
- Si la cepa esporádica tuviera una importante diseminación sólo en un hospital pero muy poca en cualquier otro, se podría pensar que se encontraría en un período de transformación de diseminación esporádica a epidémica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Prueba de *chi* cuadrado

Se aplicó la prueba de *chi* cuadrado a un nivel de significación del 95% y se evaluó la diferencia entre los tipos de *spa* (n=81). Se usó la siguiente fórmula y los valores se calcularon manualmente.

$\chi^2 = (o-e)^2/e$, donde *o* = valores observados y *e* = valor esperado

Agrupamiento jerárquico

Se analizaron las repeticiones numéricas usando el agrupamiento jerárquico UPGMA (*unweighted pair group*

with arithmetic mean), versión 15 del *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS). Se analizaron los agrupamientos a una distancia similar apropiada, representando los tipos *spa*. El tamaño del amplicón y sus respectivas repeticiones se usaron en el agrupamiento jerárquico para definir los diferentes tipos de grupos de SAMR.

Resultados

TIPIFICACIÓN

Se usaron dos grupos diferentes de cebadores para tipificar las cepas de SAMR. Se halló que el cebador “*spa*-1113F/*spa*-1514R” tipificó 74 aislados de SAMR (91,35%) mientras que el cebador “*spa*-F y *spa*-R” tipificó 61 SAMR (75,30%) (Tabla II). Se observó una diferencia altamente significativa (prueba *chi* cuadrado, $p < 0,005$) entre el número de SAMR tipificados y no tipificados. En este estudio, el gen *spa* mostró una alta variabilidad ya que se obtuvieron ocho *spa* diferentes sobre la base de su polimorfismo de región X. Se hallaron ocho productos diferentes de PCR que oscilaban entre 200 bp y 500 bp. El producto de PCR del cebador “*spa*-F/*spa*-R” mostró tres tipos claramente diferenciados de amplicones de 225 bp, 250 bp y 275 bp. Los productos de PCR del cebador “*spa*-1113F/*spa*-1514R” mostraron cuatro tipos claramente diferenciados de amplicones de 200 bp, 400 bp, 450 bp y 500 bp. El producto de PCR de 300 bp se obtuvo con ambos cebadores. Se halló que la primera selección podría cambiar los criterios para la caracterización de la cepa.

En este estudio se observó que el cebador *spa*-F/*spa*-R podría usarse donde haya interés en identificar los tipos de SAMR con amplicones de 200, 225 bp y 275 bp, mientras que el cebador “*spa*-1113F/*spa*-1514R” es un marcador epidemiológicamente más conveniente para encontrar distintos tipos de SAMR con amplicones de 400 bp, 450 bp y 500 bp. Es evidente que los tipos de SAMR con 300 bp pueden ser tipificados por un cebador “*spa*-R/*spa*-F” o “*spa*-1113F/*spa*-1514R” (Figuras 2 y 3).

POLIMORFISMO ALÉLICO

En un tipo de SAMR en particular, el número de repeticiones se evaluó por la región X. Las repeticiones calculadas para ocho productos diferentes de PCR co-

Tabla II. Comparación de tipificación y no tipificación de SAMR por cebadores específicos *spa*.

Cebadores	Tipificables	No-tipificable	Valor <i>p</i>
<i>spa</i> -F/ <i>spa</i> -R	61 (75,30%)	20 (24,69%)	$p < 0,005$
<i>spa</i> -1113F/ <i>spa</i> -1514R	74 (91,35%)	7 (8,64%)	$p < 0,005$

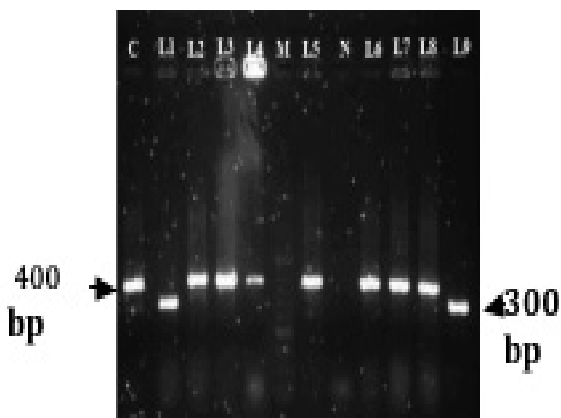


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa (3%) con dos tipos *spa* hallados con el cebador “*spa-1113F/spa-1514R*” (*M* = 50 bp). El cebador “*spa-1113F/spa-1514*” mostró amplicones de 300 bp y 400 bp. Los SAMR que se muestran en la franja número 1 y 9 fueron llevadas al tamaño de 300 bp. Los SAMR en las franjas número 2 a 8 fueron llevadas al tamaño 400 bp. La franja C tiene el control positivo de EMRSA -15 que se llevó al tamaño 400 bp. La franja N tiene control negativo.

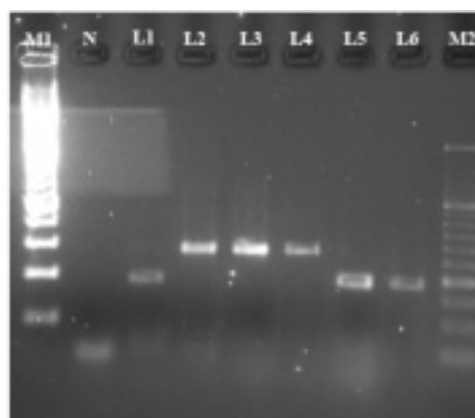


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (3%) con dos tipos *spa* hallados con el cebador “*spa-R/spa-F*” (*M1*=100 bp, *M2*= 50 bp). El cebador “*spa-R/spa-F*” mostró los tipos SAMR con 200 bp y 300 bp. El SAMR en las franjas número 1, 5 y 6 fueron llevados al tamaño 200 bp. Las cepas SAMR en franjas 2, 3 y 4 fueron llevadas al tamaño 300 bp.

respondieron a ocho tipos de polimorfismo alélico en el gen *spa*. El alelo con 6 repeticiones, llamado tipo *spa* 1 (*n*=2, 2,46%) y el alelo con 7 repeticiones llamado *spa* 2 (*n*=1, 1,23%). El tipo *spa* 1 estuvo asociado con muestras clínicas de orina y pus mientras que el tipo *spa* 2 estuvo relacionado solamente con las muestras clínicas de fractura ósea. Los tipos *spa* más importantes fueron *spa* 3, *spa* 5 y *spa* 6, ya que estos tipos se recuperaron de distintas muestras (Tabla III). El alelo con 8 repeticiones, llamado tipo *spa* 3 (*n*=25, 30, 86%), estuvo asociado con muestras clínicas de lavado broncoalveolar no dirigido (BAL), punta de catéter (CT), pus, líquido tisular, orina y esputo. El alelo con 11 repeticiones, llamado tipo *spa* 5 (*n*=36, 44,44%) estuvo relacionado con las muestras clínicas de orina, el sistema nervioso central (SNC), el oído y pus. El alelo con 15 repeticiones, llamado tipo *spa* 6 es el único tipo que se ha recogido de un número máximo de muestras clínicas como pus, SNC, fractura ósea, médula espinal, lavado bronqueo-alveolar, líquido tisular, esputo y orina. El alelo con 17 repeticiones, llamado tipo *spa* 7 (*n* = 2, 2,46%) estuvo asociado solamente con muestras clínicas de pus. El alelo con 19 repeticiones, llamado tipo *spa* 8 (*n*=4, 4,93%) se halló en muestras clínicas de pus, esputo y punta de catéter.

SAMR-E y SAMR-S

Hubo una diferencia altamente significativa (prueba *chi* cuadrado *p* <0,005) en el número de tipos *spa*; *spa* 3, *spa* 5 y *spa* 6 (Tabla III). Estos tipos *spa* fueron muy prevalentes. Hubo una diferencia no significativa (prueba *chi* cuadrado *p* <0,05) en el número de tipos *spa*; *spa* 1, *spa* 2,

spa 4, *spa* 7 y *spa* 8. Se halló que estos últimos fueron menos prevalentes (Figura 4). La mayor prevalencia se observó para el tipo *spa* 6 (71,60%) mientras que la menor prevalencia se observó para el tipo *spa* 2 (1,23%). De acuerdo a los criterios epidemiológicos de los autores, se halló que los tipos *spa*; *spa* 3 (8 repeticiones), *spa* 5 (11 repeticiones) y *spa* 6 (15 repeticiones) se diseminaron como mínimo en 3 a 5 hospitales (AMC, PIMS, Khyber, KRL, FGSH) y el número de aislados para cada tipo *spa* fue también elevado. Estos tipos *spa* también poseían más de siete repeticiones. Por lo tanto, por su número de repeticiones junto con la dispersión temporal y espacial de los aislados en distintos hospitales se los consideró como SAMR-E. Los tipos *spa* SAMR-S: *spa* 1 (6 repeticiones), *spa* 2 (7 repeticiones) se diseminaron sólo dentro de su hospital de su origen (AMC). Estos tipos *spa* tenían también 7 o menos repeticiones en la región X. Los aislados que tenían más de 7 repeticiones fueron muy pocos: *spa* 4 (10 repeticiones) de PIMS, *spa* 7 (17 repeticiones) de AMC y *spa* 8 (19 repeticiones) de los hospitales AMC y PIMS. Su diseminación espacial-temporal estuvo limitada a un mínimo de uno hasta un máximo de dos hospitales con un número menor de aislados. Además, tuvieron una ocurrencia infrecuente

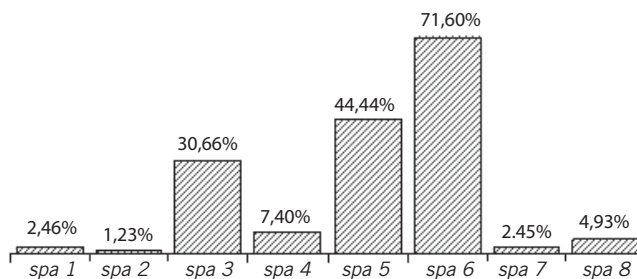


Figura 4. Prevalencia (%) de los diferentes tipos *spa* de SAMR

Tabla III. Diferentes tipos spa de SAMR identificados a partir de distintas muestras clínicas

Hospital	tipos spa	PCR Producto Tamaño (bp)	Repeticiones	Muestras clínicas
Khyber	spa 1	200	6	Pus, orina
AMC	spa 2	225	7	Fractura ósea
AMC, PIMS, Khyber, KRL, FGSH	spa 3*	250	8	Punta de catéter, LBA, pus, esputo, líquido tisular. orina
PIMS	spa 4	275	10	Sangre, pus, médula espinal, hisopado, líquido tisular
AMC, PIMS, Khyber	spa 5*	300	11	SNC, oído, pus, orina
AMC, PIMS, Khyber, KRL	spa 6*	400	15	SNC, fractura ósea, LBA, pus, médula espinal, esputo, líquido tisular, orina
AMC	spa 7	450	17	Pus
AMC, PIMS	spa 8	500	19	Punta de catéter, pus, esputo,

* Prueba del chi cuadrado para EMRSA, tipo spa es altamente significativo ($p < 0,005$).

(Tabla III). Estos últimos tres tipos spa fueron la excepción a la regla de ≤ 7 para discriminar entre SAMR-S y SAMR-E.

Las muestras clínicas de pus incluyeron una mayor variedad de tipos spa comparados con otras muestras. Hubo siete tipos spa de SAMR que estuvieron particularmente asociados con las muestras clínicas de pus excepto spa 2. Los spa 1, 2, 4, 7 y 8, portadores de 6, 7, 10, 17 y 19 repeticiones respectivamente, se observaron en muy pocas ocasiones. Los tipos spa 3, 5 y 6 con 8, 11 y 15 repeticiones respectivamente, fueron más prevalentes en las diferentes muestras clínicas.

PREVALENCIA INTER E INTRA HOSPITALARIA

El cebador “spa-F/spa-R” mostró que los tipos spa 3 y spa 5 se hallaban en porcentajes de prevalencia de 62,50% y 37,50% respectivamente en el Hospital AMC de Rawalpindi. Estas dos cepas se hallaron también en el Hospital de Khyber en Peshawar pero el porcentaje de la prevalencia fue significativamente

diferente. Además, el tipo spa 3 fue menos prevalente (26,66%) y el spa 5 fue altamente prevalente (73,33%). El spa 2 y el spa 4 fueron solamente detectados en el Hospital PIMS. El spa 2 fue solamente identificado en una muestra (5,00%) (Tabla IV).

El SAMR tipificado con el cebador “spa-1113F/spa-1514R” mostró que el tipo spa 6 estuvo presente en todos los hospitales excepto en el FGSH, pero fue el tipo más prevalente tanto en el hospital AMC como en el PIMS. El spa 5 se observó en muy pocas muestras. Este tipo fue un poco más prevalente en el hospital PIMS (8,0%) que en el hospital AMC (3,22%). El spa 6 fue el tipo más prevalente detectado en los hospitales AMC, PIMS y Khyber con prevalencia de 80,64%, 88,00% y 68,75% respectivamente (Tabla V). El spa 1 estuvo sólo disponible en el hospital Khyber de Peshawar. Los tipos spa 2, spa 3, spa 4 pudieron identificarse con el cebador “spa-F/spa-R” mientras que los tipos spa 1, spa 6, spa 7 y spa 8 pudieron identificarse con el cebador “spa-1113F/

Tabla IV. Tipos spa de SAMR (n = 61) tipificados con el cebador “spa-F/spa-R”

SAMR(n)	PCR Producto Tamaño (bp)	Número de repeticiones	Tipos spa (n)	Prevalencia de tipos spa
AMC (24)	250	8	spa 3 (15)	62,50
	300	11	spa 5 (9)	37,50
	225	7	spa 2 (1)	5,00
PIMS (20)	250	8	spa 3 (4)	20,00
	275	10	spa 4 (6)	30,00
	300	11	spa 5 (9)	45,00
Khyber (15)	250	8	spa 3 (4)	26,66
	300	11	spa 5 (11)	73,33
KRL (1)*	250	8	spa 3 (1)	-
FGSH (1)*	250	8	spa 3 (1)	-

* Un número bajo de aislados sesga la prevalencia, por lo tanto su prevalencia no ha sido calculada.

Tabla V. Tipos *spa* de SAMR (n = 74) tipificados con el cebador “*spa-1113F/spa-1514R*”.

SAMR (n)	PCR Producto Tamaño (bp)	Número de repeticiones	Tipos <i>spa</i> (n)	Prevalencia de tipos <i>spa</i>
AMC (n=31)	300	11	<i>spa</i> 5 (1)	3,22
	400	15	<i>spa</i> 6 (25)	80,64
	450	17	<i>spa</i> 7 (2)	6,44
	500	19	<i>spa</i> 8 (3)	9,67
PIMS (n=25)	300	11	<i>spa</i> 5 (2)	8,00
	400	15	<i>spa</i> 6 (22)	88,00
	500	19	<i>spa</i> 8 (1)	4,00
Khyber (n=16)	200	6	<i>spa</i> 1 (2)	6,25
	300	11	<i>spa</i> 5 (3)	12,25
	400	15	<i>spa</i> 6 (11)	68,75
KRL (n=1)*	400	15	<i>spa</i> 6 (1)	-
FGSH (n=1)*	300	11	<i>spa</i> 5 (1)	-

* Un menor número de aislados sesga la prevalencia. Por lo tanto su prevalencia no ha sido calculada.

spa-1514R”. El *spa* 5 pudo identificarse por medio de cualquiera de los dos cebadores (Tabla IV y V).

El cebador “*spa-F/spa-R*” agrupó 61 aislados de SAMR tipificados en cuatro agrupamientos (Figura 5) utilizando el agrupamiento jerárquico en el valor de similitud de 14%. Del mismo modo, “*spa-1113F/spa-1514*” agrupó 74 MRSA tipificados en cinco agrupamientos distintivos representados por tipos *spa* utilizando el agrupamiento jerárquico a distancias similares de 10% (Figura-6).

Discusión y Conclusiones

TIPIFICACIÓN

El porcentaje de tipificación mostró que el cebador “*spa-1113F/spa-1514R*” tendía a ser más específico y poseía mayor fidelidad para la región X del gen *spa* que el otro cebador “*spa-F/spa-R*”. Se halló que la probabilidad de un número mayor de tipos de SAMR podría lograrse cuando se usaba el primer cebador. La capacidad de tipificación del cebador “*spa-1113F/spa-1514R*” fue alta 91,35% (n =74) a diferencia de *spa-F/spa-R*” que fue 75,30% (n = 61). Estos resultados son similares a los de otro estudio en el que *spa* tipificó 29 (80,55%) de 36 cepas SAMR (21). Se observaron porcentajes de no tipificación de 8,64% y 24,69% para los cebadores “*spa-1113F/spa-1514R*” y “*spa-F/spa-R*” respectivamente. Se concibe que en aislados no tipificables, la región X de la proteína A podría estar ausente (20). La mutación del gen de la proteína A podría también anular la tipificación *spa* (22).

Un solo conjunto de cebadores ha sido frecuentemente usado para estudiar la tipificación *spa* (21) (23) (24) lo que hace que la comparación y discriminación

del tipo *spa* a través de PCR sean ambiguas y subjetivas. Tal como se observó en estos estudios, diferentes cebadores amplificaron diferentes productos de PCR de distintos tamaños para la misma “región X”. No obstante, podría ser beneficioso predecir de modo más confiable los diferentes tipos *spa*. Además, también es importante considerar que a veces un solo cebador puede no ser compatible debido a cambios en la conformación en la región del ADN específica donde realmente se va a ligar el cebador. Estos resultados podrían afectar los resultados de la tipificación.

Para poder comparar este trabajo con el resto de trabajos publicados, han sido calculados los tipos *spa* en base al tamaño del amplicón y se utilizó como referencia 263 bp, que consiste en 9 repeticiones tal como lo sugirieron otros autores (18). Se hallaron productos de PCR que oscilaban entre 200 bp y 500 bp. La amplificación por PCR de la región X del gen de la proteína A arrojó tamaños de amplicón que oscilaron entre 90±10 y 350±10 bp en aislados de *S. aureus* (25). En la tipificación *spa* (21) se observó un amplicón simple de 200 a 600 bp. Los productos de PCR oscilaron entre 250 bp y 637 bp en longitud para las distintas cantidades de repeticiones en la región X del gen *spa* (24). En este estudio, la diferencia en el tamaño del amplicón estuvo relacionada con la diferencia en las repeticiones, las que podían deberse a deleciones, mutaciones puntuales, duplicación o inserción de las repeticiones en la región X (16) (26).

POLIMORFISMO ALÉLICO

La tipificación *spa* mostró ocho tipos de polimorfismo alélico en la región X del gen *spa*. En un estudio, 12 tipos *spa* fueron clasificados sobre la base del tamaño del amplicón y se describieron de 2 a 13 repeticiones

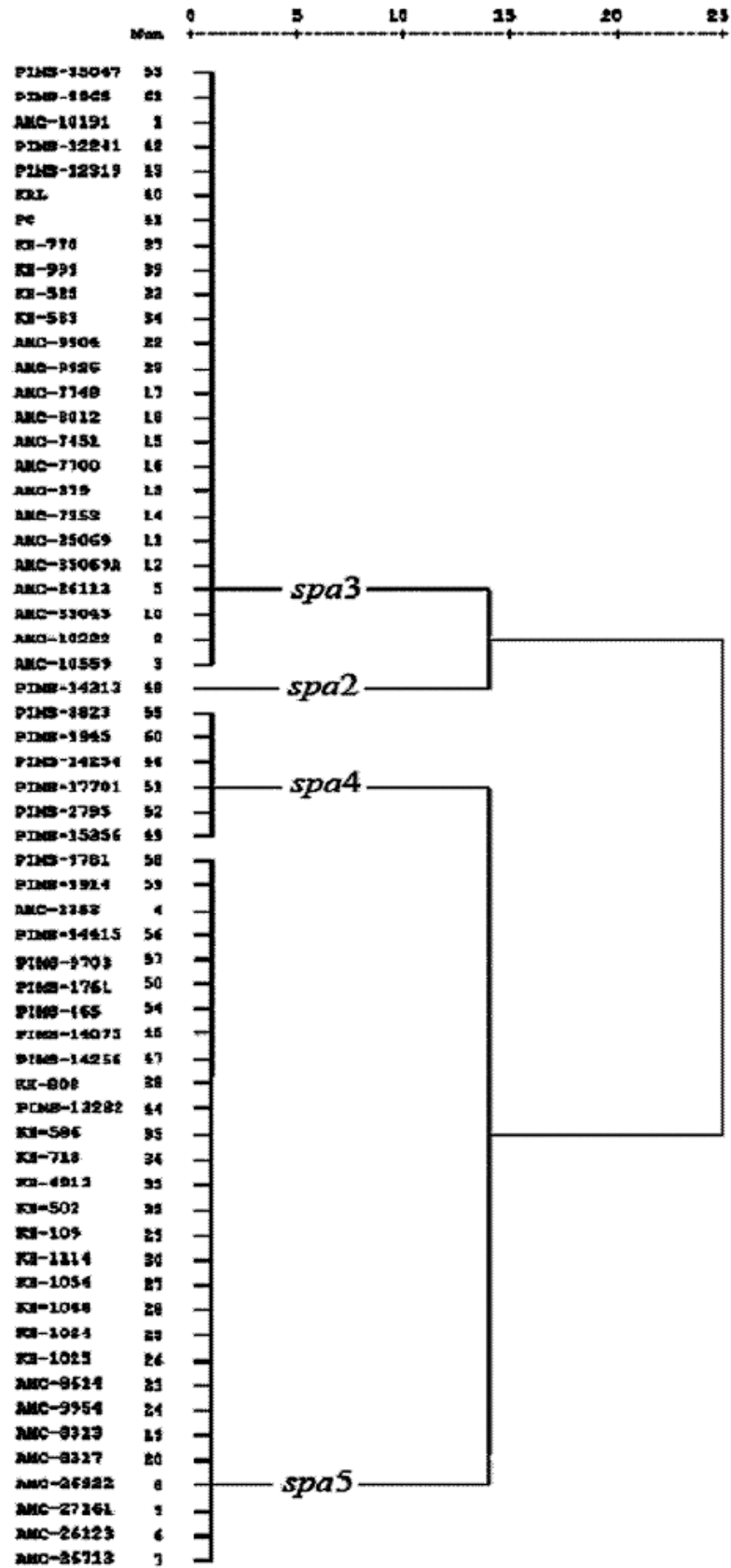


Figura 5. El dendrograma muestra los tipos *spa* basados en el número de repeticiones en la región X del gen *spa* con el cebador *spa-F/spa-R*.

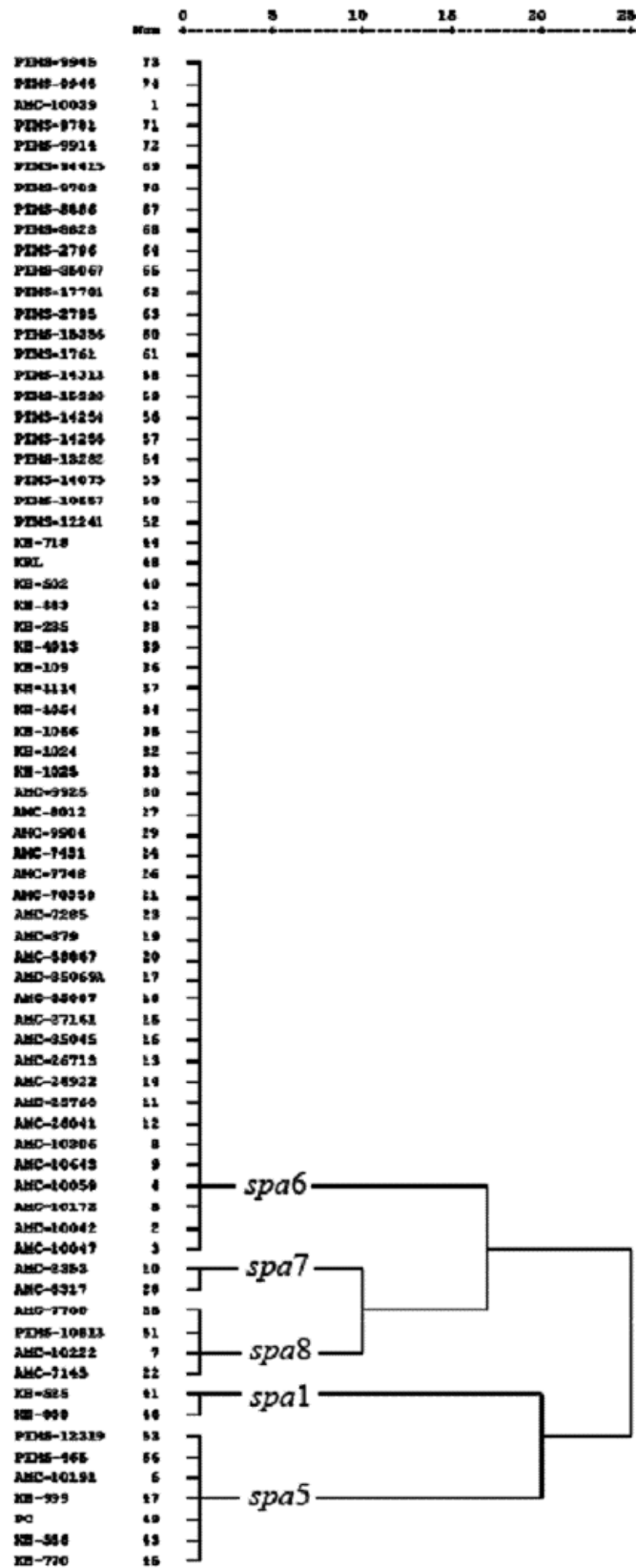


Figura 6. El dendrograma muestra los tipos spa sobre la base del número de repeticiones en la región X del gen spa con el cebador "spa-1113F/spa-1514R".

(25). En este estudio, los tipos que transportaban las repeticiones 6, 7, 8 y 11 concuerdan con los observados en estudios previos. Sin embargo, los tipos con 15, 17 y 19 repeticiones son únicos. Distintos estudios han descrito diferente número de repeticiones para diferentes tipos de cepas de SAMR. Un estudio informó 4 a 13 repeticiones en 142 aislados (27). Estas cepas de SAMR, tenían 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11 repeticiones en la región X y el tipo *spa* más común tuvo 10 repeticiones correspondientes a 556 bp (24). También observaron tipos con 2, 7, 17 y 21 repeticiones en algunas muestras. En este estudio, la cantidad de repeticiones calculadas para diferentes tipos *spa* por medio del análisis de los productos de PCR también está en concordancia con estos estudios.

En otro trabajo (18) se caracterizaron los tipos *spa* sobre la base del tamaño del amplicón y se los categorizó en cuatro tipos *spa*. Su estudio mostró que el tipo *spa* 1 (11 repeticiones, $n = 92,72\%$) era el más común y estaba implicado en la mayoría de los brotes epidémicos. El tipo *spa* 2 (10 repeticiones, $20,16\%$) estuvo relacionado con casos raros de brotes en hospitales. Los tipos *spa* 3 (9 repeticiones, $14,11\%$) y *spa* 4 (5 repeticiones, $2,2\%$) se observaron sólo en casos esporádicos. En este estudio, el tipo más común fue el *spa* 6 (15 repeticiones, $71,60\%$), que fue altamente prevalente. Los tipos *spa* 3, *spa* 5 y *spa* 6 resultaron significativamente más prevalentes que *spa* 1, *spa* 2, *spa* 4, *spa* 7 y *spa* 8 (prueba de *chi* cuadrado $p < 0,005$). En este estudio, se identificaron siete tipos *spa* de muestras clínicas de pus. La alta prevalencia de los tipos *spa* asociados con el pus puede deberse al gran número de muestras de pus disponibles en los hospitales. Otra razón puede ser la preferencia de los médicos clínicos de tomar muestras de pus para el *screening* de SAMR.

ANÁLISIS DE SAMR-E. Y SAMR-S

La tipificación *spa* surgió como un marcador de *locus* simple para la tipificación de SAMR. Los tipos *spa* 3 (8 repeticiones), *spa* 5 (11 repeticiones) y *spa* 6 (15 repeticiones) y *spa* 1 (6 repeticiones), *spa* 2 (7 repeticiones) y *spa* 3 (8 repeticiones), *spa* 4 (11 repeticiones), *spa* 7 (17 repeticiones) y *spa* 8 (19 repeticiones) fueron SAMR-S. Se ha sugerido una regla para la discriminación entre SAMR-E y SAMR-S sobre la base del gen del polimorfismo de la proteína A (23). Hallaron que la presencia de siete o menos repeticiones en la región X tendía a ser esporádica mientras que más de siete repeticiones eran indicativas del carácter epidémico de una cepa de SAMR. Los aislados SAMR-E en Pakistán cumplieron con los criterios definidos en la sección de los materiales y métodos y estuvieron en concordancia con los estudios previos (19) (23). Todos los SAMR-E tenían más de siete repeticiones pero unos pocos SAMR-S no siguieron completamente los criterios de ≤ 7 repeticiones.

Estos SAMR-S *spa* 4 (10 repeticiones), *spa* 7 (17 repeticiones) y *spa* 8 (15 repeticiones) fueron la excepción a la regla. Parecería que estos tipos son inherentemente SAMR-S y de algún modo debido a la duplicación o inserción en la región X han adquirido una cantidad mayor de repeticiones. Los aislados de SAMR con estos tipos *spa* mostraron una prevalencia epidemiológica menor entre las muestras clínicas, lo que indica que la adquisición de una región X más larga probablemente no esté correlacionada positivamente con la diseminación de la infección. Una región X más larga permite una exposición más favorable de las regiones ligando Fc a nivel de la superficie celular, facilita la infección y esto parece ser importante para la diseminación epidémica (23). Esto no se da para el SAMR-S transitorio, que tiene una región X más larga pero una diseminación restringida. Tener una región X más larga podría ser una ventaja para que SAMR-S se transforme en SAMR-E. Sin embargo este aspecto necesita ser más profundamente investigado. Estas consideraciones demandan atención y vigilancia del *spa* en el largo plazo.

La diferencia entre estos estudios y los anteriores (23) puede deberse al hecho de que no existen criterios exactos para clasificar SAMR en SAMR-E y SAMR-S de manera precisa. Aquí es importante considerar que el carácter epidémico y esporádico puede no sólo depender del número de repeticiones pero sí también de la fuente de transmisión inter/intra hospitalaria que puede originarse en el personal paramédico y en los pacientes que se trasladan de hospital a hospital. La forma con la que se puede restringir una diseminación epidémica de SAMR-S está ligada a condiciones higiénicas rigurosas.

Los *loci* múltiples en el cromosoma pueden contribuir al carácter epidémico y la región X del gen *spa* puede estar asociada con uno de estos *loci*. En un estudio anterior se halló que todos los brotes epidémicos correspondían a cepas con tipos *spa* que portaban 10 y 11 repeticiones mientras que los aislados *spa* con 5 ó 9 repeticiones eran sólo detectados en casos esporádicos (19). Un número mayor de repeticiones puede constituir una ventaja/selección natural para las cepas y ayudar a la diseminación epidémica de las mismas. Una región X más larga es importante para el carácter epidémico de la cepa (23).

PREVALENCIA DE LOS TIPOS CARACTERIZADOS EN LOS HOSPITALES PAKISTANÉES

La prevalencia inter e intrahospitalaria de diferentes tipos *spa* mostró que tanto *spa* 3 como *spa* 5 fueron cepas prevalentes en el Hospital AMC en Rawalpindi y el Hospital Khyber en Peshawar. El tipo *spa* 5 fue más prevalente en el hospital de Khyber *vs.* el hospital AMC ($73,33\%$ *vs.* $62,50\%$). Sin embargo, *spa* 3 fue más prevalente en el hospital AMC *vs.* el hospital Khyber ($62,50\%$

vs. 26,66%). Se mostró que la diseminación de *spa* 3 fue alta en el hospital AMC mientras que la diseminación de *spa* 5 fue alta en el hospital Khyber. Los tipos *spa* 2 y *spa* 4 solamente fueron detectados en el hospital PIMS, lo que sugiere que estos tipos podrían haber emergido recientemente en respuesta a los diferentes tratamientos con antibióticos que tuvieron los pacientes. PIMS es un hospital importante, que recibió pacientes de los cuatro distritos del país. En estos tipos de *spa* (*spa* 2 y *spa* 4), no debe descartarse la posibilidad de ocurrencia debida a nuevas internaciones de pacientes externos.

Spa tipo 5 se observó en unas pocas muestras pero fue más prevalente en el hospital PIMS (8,0%) que en el hospital AMC (3,22%) *Spa* tipo 6 transportaba 15 repeticiones en su región X y fue significativamente el tipo más prevalente detectado en los hospitales AMC, PIMS y Khyber. Este tipo *spa* fue aislado de la mayoría de las distintas muestras clínicas. Se podría considerar que *spa* 6 tiene más diversidad, lo que da lugar a más diseminación en los hospitales que se encuentran ubicados a cierta distancia uno del otro (hospital Khyber de Peshawar *vs.* otros hospitales). El *spa* tipo 1 sólo se encontró en el hospital Khyber de Peshawar. Este tipo mostró ser raro o un emergente reciente debido a algún motivo desconocido que merecería mayor investigación. Se ha concluido que el presente estudio ha aportado información confiable y básica acerca de la prevalencia epidemiológica de distintos tipos *spa* SAMR implicados en los hospitales de la comunidad. Además, la tipificación *spa* puede proporcionarle conocimientos adicionales al epidemiólogo del hospital, ya que estas técnicas son lo suficientemente eficientes para diferenciar las nuevas cepas *spa* que transportan variaciones en general y aquellas que lentamente se transforman de esporádicas a epidémicas.

CORRESPONDENCIA

ZAHID MAJEED C/O PROF. DR. SALMAN AKBAR MALIK, CHAIRMAN
Department of Biochemistry
Faculty of Biological Sciences
Quaid-i-Azam University, ISLAMABAD, Pakistan.
P.O Box No. 44000 Tel.: +92 51 90613012, +92 51 2601164

Referencias bibliográficas

- Kim T, Oh PI, Simor AE. The economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 99-104.
- Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). En: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. *In Principles and practice of infectious diseases*, Mandell G, Bennett J, Dolin R, (ed) Philadelphia: Churchill Living Stone; 2000, p.p 2069-92.
- National Standard Method. Health Protection Agency, UK (<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/>).
- Schneewind O, Model P, Fischetti VA. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell* 1992; 70: 267-81.
- Guss B, Uhlen M, Nilsson B, Lindberg M, Sjoquist J, Sjobahl J. Region X, *et al.* The cell-wall-attachment part of *staphylococcal* protein A. *Eur J Biochem* 1984; 138: 413-20.
- Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M, *et al.* Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem* 1984; 259: 1695-702.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, *et al.* Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5442-8.
- Ashiq B, Tareen AK. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in a teaching hospital of Karachi: A Laboratory study. *J Pak Med Assoc* 1989; 39: 6-9.
- Siddiqui GM, Karamat KA, Hanan A. Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: A study at PAF Hospital Sargodha. *Pak J Pathol* 1999; 10: 26-8.
- Forsgren A, Nordstrom K, Philipson L, Sjoquist J. Protein A mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1983; 107: 245-50.
- Khatoun N, Bukhari MH, Riaz JR, Sheikh AS, Iqbal A, Naem S, *et al.* Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection laboratory study at Mayo Hospital Lahore. *Biomedica* 2002; 18: 49-52.
- Quereshi AH, Hanan A. The prevalence and susceptibility pattern of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pak Armed Forces Med J* 2003; 53: 198-201.
- Bukhari M, Iqbal A, Khatoun N, Iqbal N, Naem S, Quereshi GR *et al.* A laboratory study of susceptibility of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Pak J Med Sci* 2004; 20: 229-33.
- Ali AM, Abbasi SA, Ari S, Mirza IA.: Nosocomial infections due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. *Pak J Med Sci* 2007; 23: 593-6.
- Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 3). *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 713-28.
- Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, Pourabbas B. Modified DNA Extraction for rapid PCR detection of Methicillin resistant staphylococci. *Iranian Biomedical J* 2003; 8 (3): 161-5.
- Strommenger BC, Kettlitz T, Weniger D, Harmsen A, Friedrich W, Witte W, *et al.* Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa* typing, Smal macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2533-40.
- Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, *et al.* New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and

- genetic relationships of clinical isolates. J Clin Microbiol 2003; 41: 1801-4.
19. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra L. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a University Hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphism. J Clin Microbiol 2002; 40: 2119-25.
 20. Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, *et al.* Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol 1996; 15: 60-4.
 21. Hoefnagels-Schuermans A, Peetermans WE, Struelens MJ, Van Lierde S, Van Eldere J. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol 1997; 35: 2514-20.
 22. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. *spa* Typing method for Discrimination among *Staphylococcus aureus* isolates: Implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. J Clin Microbiol 2004; 42: 792-9.
 23. Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, *et al.* Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. J Clin Microbiol 1994; 32: 846-7.
 24. Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, *et al.* Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. J Clin Microbiol 1994; 32: 846-7.
 25. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, *et al.* Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 1999; 39: 3556-63.
 26. Vimercati C, Cremonesi P, Castiglioni B, Pisoni G, Boettcher PJ, Stella A, *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from Cows, Goats and Sheep with intramammary infections on the basis of gene polymorphisms and toxin genes. J Vet Med 2006; 53: 423-8.
 27. Brigido MDM, Barardi CR, Bonjardin CA, Santos CL, Junqueira ML, Brentani RR, *et al.* Nucleotide sequence of a variant protein A of *Staphylococcus aureus* suggests molecular heterogeneity among strains. J. Basic Microbiol 1991; 31: 337-45.
 28. Kahl BC, Mellmann A, Deiwick S, Peters G, Dag Harmsen. Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43: 502-5.

Aceptado para su publicación el 20 de marzo de 2012