

**Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos
multirresistentes de *Staphylococcus aureus* en el
Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina
Veterinaria, Universidad Nacional**

Modalidad: Proyecto de graduación

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

María Laura Alfaro Alfaro

**Campus Pbro. Benjamín Núñez
2022**

TRIBUNAL EXAMINADOR

Laura Bouza Mora, M.Sc.

Vicedecana Facultad de Ciencias de la Salud

Julia Rodríguez Barahona, PhD.

Subdirectora Escuela de Medicina Veterinaria

Elías Barquero Calvo, PhD.

Tutor

Lohendy Muñoz Vargas, PhD.

Lectora

Caterina Guzmán Verri, PhD.

Lectora

Fecha: _____

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

Le dedico este trabajo a mis abuelos María Isabel y Mario, personas que han sido fundamentales en mi formación tanto académica como personal. Gracias abuela por enseñarme el amor a los animales, sé que estarías orgullosa de verme finalizar esta etapa y muchas gracias abuelo por ser mi apoyo incondicional en los estudios, este es el fruto del esfuerzo y de los sacrificios que hicieron por mí.

Se lo dedico también a David, la persona que estuvo ahí en los años más difíciles de la carrera dándome todo su apoyo y amor, gracias por nunca dudar de mí y siempre animarme a seguir.

Y con gran cariño y aprecio agradezco a todos los que han sido parte de mi proceso de formación en los estudios:

A mis amigos Ale, Majo, Luis, Nina y Fer por todo su apoyo, solo nosotros entendemos lo que ha costado llegar a donde estamos.

A mi tutor Elías y mis lectoras Lohendy y Caterina por su paciencia y su guía durante la carrera y este trabajo.

A todos los del laboratorio de bacterias y bioquímica/inmunología, Xindy, Dylcia, Lauren, Dionei, Nazareth, Alejandro y Carolina por siempre ser tan amables, estar dispuestos a ayudarme en lo que necesitara y hacer mis tardes de trabajo más amenas.

Y por último a mi familia por su apoyo y compañía durante estos años de carrera.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación	11
1.3 Objetivos	13
1.3.1. Objetivo General.....	13
1.3.2 Objetivos Específicos	13
2. METODOLOGÍA	14
2.1 Materiales y métodos.....	14
2.1.1 Lugar de realización del Proyecto de Graduación	14
2.1.2 Aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> para caracterización	14
2.1.3 Determinación de resistencia a cefoxitina	14
2.1.4 Confirmación genética de la resistencia a la meticilina.....	15
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4. CONCLUSIONES.....	40
5. RECOMENDACIONES	41
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencias de los cebadores para la amplificación del gen <i>mecA</i>	16
Cuadro 2. Resultados obtenidos de la prueba de difusión en disco (Kirby-Bauer) para determinar la susceptibilidad de los aislamientos de <i>S. aureus</i> a la cefoxitina.....	20
Cuadro 3. Medición de cantidad del ADN obtenido mediante el método de extracción por ebullición para la realización de la prueba PCR, obtenida con el equipo Qubit 4 fluorometer.	29
Cuadro 4. Medición de cantidad del ADN obtenido mediante el método de extracción por ebullición para llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 1%, obtenida con el equipo Qubit 4 fluorometer.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de las pruebas de difusión en disco (Kirby-Bauer) para determinar la susceptibilidad de las cepas a cefoxitina.	22
Figura 2. Fotografía del gel de agarosa al 1% luego del proceso de electroforesis para evaluar la extracción de ADN realizada a las cepas por medio del método de ebullición, obtenida con el equipo ChemiDoc XRS System..	31
Figura 3. Visualización de los amplicones obtenidos mediante la prueba de PCR en el equipo QIAxcel Advanced..	34
Figura 4. Visualización de los amplicones obtenidos mediante la prueba de PCR en el equipo QIAxcel Advanced..	35
Figura 5. Visualización de los amplicones obtenidos mediante la prueba de PCR en el equipo QIAxcel Advanced..	36
Figura 6. Electroferogramas de los amplicones obtenidos mediante la prueba de PCR en el equipo QIAxcel Advanced..	37

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

ATS: Tripticasa Soya Agar

CA-MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Asociada a la Comunidad

CCR: Recombinasas del Cassette Cromosómico

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMV: Escuela de Medicina Veterinaria

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos

OMS: Organización Mundial de la Salud

HA-MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Asociada al Hospital

INCIENSA: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud

LA-MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Asociada al Ganado

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

mm: milímetros

MPM: Marcador de Peso Molecular

MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

MSSA: *Staphylococcus aureus* Susceptible a Meticilina

NaCl: Cloruro de sodio

ng: nanogramos

°C: grados centígrados

OS-MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Sensible a Oxacilina

pb: Pares de Bases

PBP: Proteínas de Unión a Penicilina

PBP2: Proteína de Unión a Penicilina 2

PBP2a: Proteína de Unión a Penicilina 2a

PBP2aLGA: Proteína de Unión a Penicilina 2aLGA

PBP4: Proteína de Unión a Penicilina 4

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RCF: Relative Centrifugal Force

SCCmec: Cassette Cromosómico Estafilocócico mec

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA

Tris: Trisaminometano

µg: microgramos

µL: microlitros

nM: nanomolar

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria oportunista que puede causar infecciones en animales y seres humanos cuando las barreras cutáneas y mucosas se rompen. Estas infecciones se han convertido en una amenaza para la salud pública a causa del fenómeno de resistencia a los antibióticos que dio origen al surgimiento de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA).

En el estudio de Segura-Lobo 2020 se generó evidencia sobre la prevalencia de *S. aureus* y MRSA en seres humanos relacionados al quehacer veterinario. Para clasificar los aislamientos obtenidos en este estudio como MRSA, se utilizó el sistema automatizado Vitek 2, el cual no es un método confirmatorio de este mecanismo y por lo tanto sus resultados deben ser comprobados por métodos avalados para este fin. El presente trabajo confirma estos resultados (utilizando 24 posibles aislamientos MRSA y dos posibles aislamientos susceptibles del estudio) por medio de la prueba de difusión en disco con cefoxitina y la amplificación del gen *mecA* por medio de PCR (pruebas avaladas por el CLSI).

De las 24 cepas clasificadas como MRSA por el equipo Vitek 2, 23 (95,83%) se identificaron como resistentes a cefoxitina (MRSA), el aislamiento restante se identificó como susceptible a cefoxitina y los dos posibles aislamientos susceptibles por Vitek 2, se clasificaron como susceptibles a cefoxitina (MSSA) mediante la prueba de difusión en disco. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la prueba de PCR, donde los aislamientos resistentes a cefoxitina amplifican una banda de 310 pb correspondiente al gen *mecA* y los aislamientos susceptibles a cefoxitina no.

Debido a los resultados inexactos que se pueden presentar con el Vitek 2, se recomienda comprobar los fenotipos de resistencia obtenidos mediante este método con la prueba de difusión en disco con cefoxitina y en caso de discrepancias, se aconseja el uso de la prueba de PCR para determinar la presencia o ausencia del gen *mecA*.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, Cefoxitina, Vitek, Reacción en cadena de la Polimerasa

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an opportunistic bacterium that can cause infections in animals and humans when the skin and mucosal barriers are broken. These infections are a public health threat due to the emergence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA).

According to Segura-Lobo and colleagues (2020), the prevalence of *S. aureus* and MRSA in humans related to veterinary practice in Costa Rica was identified. The Vitek 2 automated system was used to classify the isolates obtained in this study as MRSA. This is not a confirmatory method of this mechanism; hence the results must be verified by other methods. In this work, 24 expected MRSA isolates and two expected susceptible isolates were evaluated by the disk diffusion test with cefoxitin and amplification of the *mecA* gene by PCR (tests endorsed by the CLSI).

Of the 24 strains classified as MRSA by the Vitek 2, a total of 23 (95.83%) were identified as resistant to cefoxitin (MRSA), one isolate was identified as susceptible to cefoxitin and the two expected susceptible isolates identified by the Vitek 2 were classified as susceptible to cefoxitin (MSSA) by the disk diffusion test. These results correlate with those obtained by the PCR test, for which cefoxitin-resistant isolates amplified a 310 bp band corresponding to the *mecA* gene, and which differed from those cefoxitin-susceptible isolates.

Due to the inaccuracy observed on the Vitek 2 results, it is recommended to confirm the resistance phenotypes using the disk diffusion test with cefoxitin. In case of discrepancies, the use of the PCR test is highly recommended in order to determine the presence or absence of the *mecA* gene.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Cefoxitin, Vitek, Polymerase chain reaction

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las bacterias del género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm , generalmente agrupadas formando racimos, no móviles, no esporuladas, anaerobias facultativas y la mayoría producen la enzima catalasa (Cervantes-García et al. 2014).

Dentro de este género hay una gran variedad de especies; sin embargo, *Staphylococcus aureus* es la especie más importante desde el punto de vista clínico (Lee et al. 2018). Esta bacteria es resistente al calor, la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de NaCl (7,5%) (Cervantes-García et al. 2014). *S. aureus*, además, es positiva para la prueba de producción de coagulasa, el cual es un factor de virulencia y se utiliza como marcador para su identificación (Gajdács 2019).

S. aureus suele formar parte del microbioma normal de los seres humanos, colonizando varios sitios como fosas nasales, garganta, áreas específicas de la piel (axila, ingle, perineo) y recto (Gajdács 2019; Garzón et al. 2019). Existen estimaciones basadas en estudios previos (Wertheim et al. 2005; Becker et al. 2017) que indican que entre 20 y 40% de la población mundial es portadora de *S. aureus* en fosas nasales (Lee et al. 2018). A partir de los sitios donde la bacteria habita, ésta puede mobilizarse a cualquier punto de la piel, mucosas o a otras personas por transferencia interpersonal, a través de aerosoles o por contacto directo, en donde la colonización es un factor de riesgo para infecciones posteriores (Cervantes-García et al. 2014).

S. aureus es un patógeno oportunista que puede acceder a los tejidos subyacentes y provocar una infección cuando se rompen las barreras cutáneas y mucosas (por afecciones cutáneas, heridas o intervenciones quirúrgicas). Debido a la reacción inmune que causa, la infección generalmente se acompaña de formación de abscesos (Lee et al. 2018; Pollitt et al. 2018). Las infecciones pueden variar desde lesiones cutáneas superficiales, pasando por abscesos profundos, hasta bacteremias y sepsis potencialmente mortales (Pollitt et al. 2018). *S. aureus* se ha asociado también con infecciones como endocarditis, infecciones osteoarticulares, pleuropulmonares, del tracto urinario, por dispositivos médicos permanentes, meningitis, abscesos epidurales, tromboflebitis séptica y debido a las toxinas que produce, también se asocia con el síndrome de choque tóxico o como una enfermedad de transmisión alimentaria (Gajdács 2019).

Aparte de su importancia en la salud humana, *S. aureus* es un patógeno importante en medicina veterinaria, ya que tiene un impacto en la salud de los animales y provoca importantes pérdidas económicas, especialmente en la producción de la ganadería de leche (Peton y Le loir 2014). La bacteria puede encontrarse colonizando animales sanos, los cuales pasan a ser portadores y actúan como reservorios que pueden desenlazar infecciones en los seres humanos. Estudios en varias partes del mundo reportan que alrededor de un 90% de los pollos (Japón), 42% de los cerdos (Japón), 29% de las ovejas (Francia) y entre 14-35% de las vacas (Estados Unidos) son portadoras de *S. aureus* (Haag et al. 2019). Los caninos y felinos no son típicamente colonizados, sino que forman asociaciones transitorias que en ocasiones pueden conducir a infecciones graves; además, esta bacteria también ha sido aislada

de una gran cantidad de animales de vida silvestre como ardillas rojas, osos negros, cebras, mapaches, delfines, focas, rinocerontes negros, jabalíes, macacos, simios, pinzones, ánades reales, ciervos, buitres y cabras montés (Haag et al. 2019).

Las enfermedades de la piel constituyen la mayor parte de las infecciones estafilocócicas notificadas en animales (Peton y Le loir 2014). En caballos se ha identificado con frecuencia lesiones como abscesos cutáneos y celulitis (Peton y Le loir 2014). En el ganado y en pequeños rumiantes, *S. aureus* es un importante agente causal de mastitis (problema en salud pública) (Haag et al. 2019). En el caso de los pollos, la pododermatitis es la infección más común (Peton y Le loir 2014). Por último, en animales de compañía se han recuperado cepas de origen humano que se asocian a infecciones de piel y tejidos blandos (Haag et al. 2019). Expuesto lo anterior, cabe resaltar que la preocupación por estas infecciones tanto en animales como en seres humanos ha aumentado con el paso de los años a causa del fenómeno conocido como resistencia a los antibióticos (WHO 2020).

Los antibióticos son medicamentos diseñados y utilizados para tratar infecciones (WHO 2020). La resistencia a los antibióticos es considerada una enfermedad emergente según la OMS (Organización Mundial de la Salud) y ocurre cuando las bacterias expresan mecanismos (inducidos como respuesta al uso de estos medicamentos), que les permiten sobrevivir aún en presencia de estos (CDC 2020; WHO 2020). Estas bacterias resistentes infectan a los humanos y animales y causan infecciones que son más difíciles o en algunos casos imposibles de tratar, generando

así mayores costos médicos, estadías hospitalarias prolongadas y una mayor mortalidad (WHO 2020).

Algunas causas del desarrollo de la resistencia a los antibióticos son: (i) el uso excesivo, (ii) la falta de regulación sobre la compra, (iii) la carencia de pautas y recomendaciones para un uso estandarizado a nivel país, (iv) la falta de programas de educación, entre otros (WHO 2020). Otras causas importantes son las prescripciones inadecuadas (muchas veces innecesarias, inapropiadas o subóptimas), el uso agrícola extensivo y la baja disponibilidad de antibióticos nuevos (Ventola 2015).

Cada año en los Estados Unidos (EE. UU.), al menos 2,8 millones de personas se infectan con bacterias resistentes a los antibióticos, y más de 35 000 personas mueren como resultado, sin embargo, esto no es solo un problema localizado, es una crisis global (CDC 2020). Las bacterias resistentes pueden afectar a las personas en cualquier etapa de vida y se pueden propagar a través de entornos, incluidas las comunidades, el suministro de alimentos, los centros de salud, veterinaria, agricultura, el medio ambiente y en todo el mundo (CDC 2020). Por esto, la resistencia a los antibióticos es un problema de una sola salud (la salud de las personas se relaciona con la salud de los animales y el medio ambiente) y uno de los problemas de salud pública más urgentes del mundo, ya que, si los antibióticos pierden su eficacia, se pierde la capacidad de tratar y controlar infecciones que se consideran amenazas, comprometiendo así muchos avances médicos (CDC 2020).

Es por todo lo expuesto que en la Asamblea Mundial de la Salud de mayo de 2015 se aprobó un Plan de Acción Mundial Sobre la Resistencia a los Antimicrobianos

con el objetivo de prevenir y tratar enfermedades infecciosas con medicamentos seguros y eficaces (WHO 2020). Este plan ha sido tomado como base por los países miembros para la elaboración de planes nacionales y es por esto por lo que, desde el 2018 Costa Rica cuenta con un Plan Nacional de Contención de Resistencia a los Antimicrobianos (Arce-Villalobos et al. 2020).

Para dar respuesta a la necesidad de información para la toma de decisiones en cuanto al uso correcto de los antimicrobianos, es que en el 2012 se inició con el Plan Piloto: Vigilancia de Laboratorio de la Resistencia a los Antimicrobianos a nivel hospitalario, con un trabajo colaborativo entre el Centro Nacional de Referencia de Bacteriología del INCIENSA con un grupo interdisciplinario del Hospital Nacional de Niños y cuatro hospitales más (Geriatría y Gerontología, Calderón Guardia, La Católica y San Juan de Dios) que se unieron en el 2014 (Jiménez-Pearson et al. 2020). Asimismo, al ser el sector pecuario parte de la Comisión Nacional de la Resistencia Antimicrobiana, éste formuló su propio plan llamado Plan Estratégico y Operacional Pecuario de Lucha Contra la Resistencia a los Antimicrobianos (Suarez-López et al. 2018). Este Plan tiene el propósito de comunicar, formar y educar, vigilar, investigar, prevenir y controlar el uso y acceso de los antimicrobianos, siempre con el objetivo de disminuir la presentación de la resistencia antimicrobiana que afecta severamente la salud animal, pública y la economía del país (Suarez-López et al. 2018; Arce-Villalobos et al. 2020).

El Centro para el control y la prevención de enfermedades de los EE. UU. evaluó las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos de acuerdo con siete factores:

impacto clínico, impacto económico, incidencia, proyección de incidencia a diez años, transmisibilidad, disponibilidad de antibióticos efectivos y barreras para la prevención. Con base en estos factores se clasificaron una serie de bacterias como amenazas urgentes, graves y preocupantes, siendo las urgentes y graves las que requieren más actividades de vigilancia y prevención (Ventola 2015). *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) se encuentra dentro de la lista de bacterias catalogadas como amenazas graves (CDC 2020).

Las infecciones por *S. aureus* se han tratado típicamente con antibióticos betalactámicos, definidos químicamente por la presencia de un anillo betalactámico que determina su mecanismo de acción para inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana (Suárez y Gudiol 2009). Para que el betalactámico sea activo debe estar unido a otros radicales (habitualmente otros anillos). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias del esqueleto básico formado por dos anillos, modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a diferentes grupos de betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas (Suárez y Gudiol 2009).

En 1940 la penicilina G (penicilina de origen natural) era el antibiótico de elección, sin embargo, para la misma década surgió la resistencia a éste, mediada por penicilinasas estafilocócicas (enzimas bacterianas que desactivan a las penicilinas naturales y aminopenicilinas al romper el anillo betalactámico) (Morris et al. 2017; Turner et al. 2019). En respuesta, se desarrolló la meticilina alrededor de 1960, una penicilina semisintética resistente a la penicilinasas; sin embargo, dentro de un año de

su primer uso clínico se observó resistencia a esta nueva molécula (Jevons 1961; Turner et al. 2019).

En el caso de MRSA, la resistencia se debe a la presencia de un elemento genético móvil llamado cassette cromosómico estafilocócico mec (*SCCmec*), el cual es adquirido por transferencia horizontal y se encuentra en el componente accesorio del genoma bacteriano (Turner et al. 2019; Mizusawa y Carroll 2020). El *SCCmec* está compuesto por el complejo genético denominado *ccr* (codifica para las recombinasas *ccrA* y *ccrB*, las cuales permiten la movilidad del *SCCmec* entre las cepas estafilocócicas), el complejo genético *mec* (codifica para *mecA* o *mecC*, responsables del fenotipo de resistencia) y tres regiones J, según las combinaciones de estos complejos y las variaciones de las regiones J se pueden identificar catorce tipos y subtipos de *SCCmec* (Turner et al. 2019; Mizusawa y Carroll 2020).

Todos los tipos de *SCCmec* contienen *mecA* (menos el tipo XI, que contiene el homólogo *mecC*) que confiere resistencia a los betalactámicos. La resistencia se explica de la siguiente manera, estos antibióticos normalmente se unen a las proteínas de unión a penicilina (PBP) nativas de *S. aureus*, inhibiendo la biosíntesis de peptidoglicano de la pared bacteriana, sin embargo, en MRSA el gen *mecA* codifica la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a), la cual tiene una afinidad extremadamente baja para toda la clase de antibióticos betalactámicos (Lee et al. 2018). En el caso del homólogo *mecC*, este codifica la PBP2aLGA y el nivel de resistencia a la meticilina depende de este gen y genes en el trasfondo genético de la cepa (Lee et al. 2018).

Adicionalmente, en el 2018 se describió en el Hospital Universitario de Münster, Alemania, un informe de un aislamiento de MRSA que resultó negativo para la presencia de los genes *mecA* y *mecC*. Se encontró que en este aislamiento la resistencia a la meticilina estaba mediada por plásmidos basada en *mecB*, pero el mecanismo de resistencia codificado por *mecB* aún no se ha aclarado (Becker et al. 2018).

Aunque la meticilina ya no se usa en la práctica clínica debido a su toxicidad, el término "resistente a la meticilina" ha persistido y se usa para indicar resistencia por parte de *S. aureus* a todos los betalactámicos, excepto la generación más nueva de cefalosporinas (ceftarolina y ceftobiprol) que fueron desarrolladas específicamente para el tratamiento de infecciones por MRSA (Morris et al. 2017; Lee et al. 2018). En algunas ocasiones, MRSA puede expresar co-resistencia a cualquier combinación de otras clases de fármacos, incluidos macrólidos, lincosamidas, sulfonamidas, fluoroquinolonas, aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y rifampicina (Morris et al. 2017; CDC 2019; Garzón et al. 2019).

En la década posterior a su descripción inicial, MRSA fue responsable de brotes hospitalarios en muchas partes del mundo, se observó un cambio en su epidemiología cuando se detectó en individuos sin contacto previo con ambientes hospitalarios y desde mediados de la década del 2000, también se ha asociado con la exposición al ganado (Lee et al. 2018). Por esto las infecciones por MRSA se agrupan en: (i) asociadas a la atención médica (HA-MRSA), (ii) asociadas a la comunidad (CA-MRSA) y (iii) asociadas al ganado (LA-MRSA) (Haag et al. 2019).

Más recientemente infecciones causadas por MRSA se informan con frecuencia en personas que trabajan no solo con especies animales de abasto, sino también con especies de compañía. La mayor prevalencia de portadores de MRSA en el personal veterinario ha sido probada por múltiples estudios en todo el mundo (Moodley et al. 2008; Wulf et al. 2008; Neradova et al. 2020). Los aislamientos de MRSA que circulan en animales de compañía, pertenecen principalmente a cepas humanas nosocomiales. Esto indica que MRSA aislado de animales de compañía puede originarse en humanos y esos animales representan un reservorio para una posible reinfección humana (Aires de Sousa 2017; Neradova et al. 2020). Adoptar un enfoque de UNA SOLA SALUD es crucial hoy en día cuando se busca controlar la propagación de MRSA. Tanto la comunidad como los reservorios animales deben ser controlados para evitar el desarrollo de nuevos brotes nosocomiales (Aires de Sousa 2017).

En cuanto a la identificación de MRSA, a nivel de laboratorio es posible utilizar métodos fenotípicos y moleculares. En el caso de los métodos fenotípicos, los medios cromogénicos son una opción para detectar MRSA en 18-24 h de incubación (Mizusawa y Carroll 2020). También es posible realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos como, por ejemplo, la dilución en agar/tubo de agar o la difusión en disco (Al-Obaidi et al. 2018). El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) recomienda realizar pruebas como difusión en disco con cefoxitina y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) con oxacilina o cefoxitina (CLSI 2021). Para los métodos genotípicos o moleculares existen ensayos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. (FDA) para la detección molecular del gen *mecA*, como las pruebas de

amplificación de ácidos nucleicos (como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR) (CDC 2019).

Otras pruebas detectan la proteína de unión a penicilina 2a o PBP2a, mediante anticuerpos monoclonales anti-PBP2a, disponibles como la aglutinación de látex o ensayos de membrana inmunocromatográfica (Mizusawa y Carroll 2020). Además, varios instrumentos automatizados como Vitek 2, MicroScan, Phoenix y Sensititre, que utilizan algoritmos basados en la susceptibilidad tanto a la oxacilina como a la cefoxitina para determinar la resistencia, han demostrado altas sensibilidades y especificidades para las cepas de MRSA probadas (Lee et al. 2018; Mizusawa y Carroll 2020).

Pese a los diferentes métodos existentes para la identificación de MRSA, el CLSI indica que los métodos definitivos son los que detectan específicamente el gen *mecA*, la proteína PBP2a y los métodos fenotípicos manuales que utilizan cefoxitina y oxacilina (CLSI 2021). Para la detección del gen el estándar de oro es el uso de sondas de ácidos nucleicos moleculares para la amplificación por PCR y en cuanto a los métodos fenotípicos, el uso de cefoxitina se recomienda porque es más probable que detecte cepas hetero resistentes (presencia de dos subpoblaciones, una resistente y otra susceptible, coexistiendo dentro de un cultivo, todas pueden portar la información genética para la resistencia, pero solo un pequeño número puede expresarla *in vitro*) al ser un mejor inductor del gen *mecA* en comparación con otros antibióticos usados. Además, las pruebas que lo usan dan resultados más reproducibles y precisos (CDC 2019; Monson y Nielsen 2019). Por último, cuando el mecanismo de resistencia está

mediado por el gen *mecC*, los métodos automatizados que usan oxacilina no lo detectan, solo se detecta de manera confiable cuando se utiliza cefoxitina (MIC será típicamente resistente a cefoxitina y susceptible a oxacilina) (Widen y Tang 2018; CLSI 2021).

1.2 Justificación

Los *S. aureus* resistentes a la meticilina son un reto terapéutico, causan impacto en la morbilidad, la mortalidad y la economía. Estas bacterias han demostrado una versatilidad sobresaliente al surgir y diseminarse en diferentes entornos (hospitales, comunidad y más recientemente en animales) (CDC 2020). Por estos factores MRSA se ha convertido en una seria amenaza para la salud animal, la seguridad alimentaria y, en consecuencia, la salud pública.

Debido a su importancia, en Costa Rica se realizan esfuerzos para disponer de información sobre la resistencia a los antibióticos en las diferentes áreas (clínica humana, veterinaria, producción de alimentos, ambiente), que conduzca a una vigilancia epidemiológica con toma de decisiones sobre el uso adecuado de los antibióticos aún disponibles, así como para valorar la introducción de moléculas nuevas como opciones de tratamiento (Jimenez-Pearson et al. 2020). Para que esto sea posible, es necesario realizar no solo la correcta identificación de los microorganismos sino la caracterización definitiva de sus mecanismos de resistencia.

En la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (EMV), se han realizado investigaciones que proporcionan información importante sobre la prevalencia de MRSA tanto en superficies de contacto humano y animal (29,41%, 30/102) (Rojas-Nuñez 2014), así como en los estudiantes y trabajadores que se

desempeñan en contacto frecuente con animales en la Escuela de Medicina Veterinaria (Segura-Lobo 2020).

En el trabajo presentado por Segura-Lobo 2020 se determinó la prevalencia de *S. aureus* y los perfiles de sensibilidad antibiótica de aislamientos obtenidos a partir de 159 personas que se dividían en tres grupos: (i) personas de la EMV con alta exposición laboral a animales, (ii) personas de la EMV con menos contacto animal y (iii) personas sin contacto animal de la Facultad de Filosofía y Letras de la Universidad Nacional. Las prevalencias más altas de *S. aureus* fueron en el grupo de la EMV con mayor contacto laboral con animales (63%; 25/40), seguido por el grupo de la EMV con menor contacto (41%; 24/58) y el grupo sin contacto (30%; 18/61). De igual manera, la prevalencia más alta de MRSA fue la población de la EMV con mayor contacto laboral con animales (30%; 12/40), seguido por la población con menor contacto (16%; 9/58) y el grupo sin contacto (7%, 4/61). Este estudio generó la primera evidencia en Costa Rica con relación a la prevalencia de la bacteria *S. aureus* y MRSA en seres humanos y el quehacer veterinario en un ambiente laboral universitario.

En esta investigación el método utilizado para determinar los patrones de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *S. aureus* y de este modo clasificarlos como MRSA fue el sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux). Aunque la metodología en la que se basa este equipo es altamente sensible y específica para detectar las bacterias tipo MRSA, esta metodología no se encuentra dentro de los procedimientos avalados por el CLSI para este fin, por lo que cuando las bacterias presentan un fenotipo de MRSA en el equipo Vitek 2, este debe ser confirmado o descartado mediante el uso de las metodologías aprobadas por el CLSI.

El presente trabajo pretende confirmar mediante las metodologías aprobadas por el CLSI, los resultados obtenidos por Segura-Lobo (2020), aportando información en la caracterización fenotípica y molecular de todos los aislamientos sospechosos de ser MRSA de este estudio. Esto se realizó por medio de la prueba de susceptibilidad a cefoxitina por difusión en disco y la amplificación del gen *mecA* por medio de PCR.

1.3 Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Investigar la presencia de aislamientos tipo MRSA en aislamientos multirresistentes de *Staphylococcus aureus* almacenados en el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la susceptibilidad a la cefoxitina en aislamientos *S. aureus* mediante pruebas fenotípicas de difusión en disco.
2. Determinar la presencia o ausencia del gen *mecA* mediante la realización de una prueba de PCR en aislamientos de *S. aureus*.

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Lugar de realización del Proyecto de Graduación

El proyecto se realizó en los Laboratorios de Bacteriología, Inmunología y Bioquímica de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.1.2 Aislamientos de *Staphylococcus aureus* para caracterización

Se utilizaron en total 26 aislamientos crio conservados e identificados como *S. aureus*, los cuales están conservados a -80°C en la bacterioteca del Laboratorio de Bacteriología la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Estos aislamientos se obtuvieron como parte del trabajo final de graduación de maestría de la estudiante Natalia María Segura Lobo titulado "Estudio exploratorio descriptivo sobre la exposición laboral a *S. aureus* y la percepción a los riesgos biológicos presentes en las actividades que desempeñan los trabajadores y estudiantes en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica" el cual fue avalado por el CECUNA (UNA-CECUNA-ACUE-71-2019), y en el cual se avala la realización de análisis adicionales a las muestras positivas del estudio mediante pruebas genéticas y moleculares.

2.1.3 Determinación de resistencia a cefoxitina

La identificación de los *S. aureus* resistentes a la cefoxitina se realizó mediante el método estandarizado de difusión con discos (Kirby-Bauer), utilizando agar Mueller-Hinton (BD, Lugar de origen: New Jersey, EE. UU.) y discos de cefoxitina de 30 µg

(Oxoid, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.) de acuerdo con la metodología sugerida por el CLSI. Brevemente, se realizó una suspensión de la bacteria previamente descongelada y cultivada en agar ATS (Liofilchem, Lugar de origen: Teramo, Italia) (crecimiento de 24 horas) en solución salina a 0.85% a una equivalencia de 0.5 McFarland y se inoculó en agar Mueller-Hinton (BD, Lugar de origen: New Jersey, EE. UU.). Posteriormente se colocaron los sensidiscos de cefoxitina y se incubaron a 35°C por 16-18 horas. Se consideraron como resistentes aquellas cepas que presentaron halos de inhibición iguales o menores a 21 mm, según normas establecidas por el CLSI 2021. Se utilizaron dos cepas de referencia de *S. aureus*, como controles del ensayo, la cepa *S. aureus* ATCC 25923 (control negativo, susceptible a la meticilina, MSSA) y la cepa *S. aureus* ATCC 43300 (control positivo, resistente a la meticilina, MRSA).

2.1.4 Confirmación genética de la resistencia a la meticilina

La confirmación genética de la resistencia a meticilina se realizó en todos los aislamientos de *S. aureus* mediante una prueba de PCR para la detección del gen *mecA*. Se utilizó el procedimiento previamente descrito por Jonas y colaboradores 2002. Se manejaron dos cebadores para la detección del gen *mecA* (*mecA* 1 y *mecA* 2) (Integrated DNA technologies, Lugar de origen: Iowa, EE. UU.) (Cuadro 1).

Cuadro 1.

Secuencias de los cebadores para la amplificación del gen mecA.

Cebador	Secuencia	Tamaño del producto amplificado
<i>mecA 1</i>	5' -GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	310 pb
<i>mecA 2</i>	5' -CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	

La realización de este PCR se compuso de cuatro etapas: (i) extracción de ADN, (ii) amplificación de la secuencia del ADN, (iii) visualización del producto amplificado e (iv) interpretación de los resultados. Al igual que en el ensayo de cefoxitina, se utilizaron dos cepas de referencia, *S. aureus* ATCC 25923 (control negativo, susceptible a la meticilina, MSSA) y *S. aureus* ATCC 43300 (control positivo, resistente a la meticilina, MRSA).

Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método de ebullición o calentamiento a partir de un cultivo fresco (crecimiento de 24 horas en agar ATS) de las cepas aisladas de *S. aureus* y de las cepas utilizadas como control positivo y negativo. De los cultivos de cada cepa se tomó con un asa bacteriológica de una a

diez colonias (dependiendo del tamaño de estas) que se suspendieron en tubos Eppendorf conteniendo 100 μ L de agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.). Posteriormente, estos se introdujeron en un agitador magnético (Thermo Scientific, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.) con agua hirviendo, donde se mantuvieron a 100°C durante diez minutos y finalmente fueron centrifugados en el Centrifuge 5418 (Eppendorf, Lugar de origen: Hamburg, Alemania) por cinco minutos a 16873 rcf, para obtener el sobrenadante conteniendo el ADN a utilizar posteriormente en la amplificación.

Para evaluar la extracción total del ADN obtenido, se realizó la medición de cantidad de ADN de dos de las cepas y de los controles positivo y negativo por medio del Qubit 4 fluorometer (Thermo Scientific, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.) y se sometieron a una electroforesis (100 voltios durante 60 minutos) en gel de agarosa al 1% en un buffer TBE al 0.5x (890 mM Tris, 890 mM ácido bórico, 20 mM EDTA pH ocho) con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Lugar de origen: Missouri, EE. UU.) para su tinción. El gel se cargó con 30 μ L del ADN extraído con 5 μ L solución de montaje: Orange ADN Loading Dye 6x (Thermo Scientific, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.) y con 4 μ L del marcador de peso molecular Mass ruler DNA ladder, mix ready to use 103 ng/ μ L, 500 μ L (Thermo Scientific, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.).

Amplificación del ADN

La reacción de amplificación del ADN se llevó a cabo utilizando agua para PCR libre de nucleasas (Thermo Scientific, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.), PCR Máster Mix (2X) (Thermo Scientific, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.), dos

cebadores para la detección del gen *mecA* (*mecA* 1 y *mecA* 2) (Integrated DNA technologies, Lugar de origen: Iowa, EE. UU.) a una concentración de 10 nM y el ADN extraído de cada cepa. Se utilizaron tubos de PCR en un enfriador para PCR (Eppendorf, Lugar de origen: Hamburg. Alemania) para el montaje de las reacciones. Por cada una se utilizó 7,5 μ L de agua para PCR libre de nucleasas, 12,5 μ L de PCR Máster Mix, 1 μ L de *mecA* 1, 1 μ L de *mecA* 2 y 3 μ L del ADN extraído, para un volumen final de 25 μ L por tubo.

Los ciclos se llevaron a cabo con un equipo termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems™, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.). Las condiciones para la amplificación fueron: cinco minutos para la pre-desnaturalización a 95°C, seguido de 30 ciclos de amplificación (un minuto para desnaturalizar a 95°C, un minuto para la hibridación a 54° C y un minuto a 72°C para el proceso de extensión), y una última fase de extensión de siete minutos a 72°C; posteriormente se realizó un enfriamiento hasta 4°C (Jonas et al. 2002).

Visualización del producto amplificado e interpretación de los resultados

La visualización de los amplicones se realizó con el equipo QIAxcel Advanced (Qiagen, Lugar de origen: Hilden, Alemania), donde las bandas correspondientes para el gen *mecA* fueron bandas de un peso molecular de 310 pb.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Prueba fenotípica de difusión en disco: susceptibilidad a cefoxitina

Como se mencionó anteriormente, en el trabajo de Segura-Lobo 2020 se aislaron cepas de *S. aureus* de 159 personas, de estas muestras 25 se identificaron como posibles cepas MRSA por medio del equipo automatizado Vitek 2. En el Cuadro 2 se observan 24 de estos posibles aislamientos MRSA (identificados por el número de muestra) y adicionalmente dos cepas (correspondientes a los números 303 y 309) que en el estudio fueron identificadas como *S. aureus* susceptibles a meticilina (MSSA) por el equipo.

Luego de realizar el procedimiento de montaje para la prueba de difusión en disco y de esperar el período establecido de incubación se obtuvo, por medio del uso de un caliper, la medición en milímetros del halo de inhibición para cada aislamiento que se puede contemplar en el Cuadro 2. El disco de cefoxitina utilizado tenía una medición de 6 mm, por lo que cuando no se formaba halo, la medición se expresaba como menor a 6 mm, como se puede apreciar en el caso de las muestras 125 y 241 del Cuadro 2.

Cuadro 2.

Resultados obtenidos de la prueba de difusión en disco (Kirby-Bauer) para determinar la susceptibilidad de los aislamientos de S. aureus a la cefoxitina.

N° de muestra	Medición del halo de inhibición (mm)	Interpretación
Control positivo	14,02	Resistente
Control negativo	25,41	Susceptible
116	9,93	Resistente
120	10,73	Resistente
121	12,44	Resistente
123	10,30	Resistente
124	9,80	Resistente
125	<6	Resistente
128	12,95	Resistente
133	6,54	Resistente
138	6,66	Resistente
209	11,88	Resistente
217	10,68	Resistente
218	12,38	Resistente
230	14,68	Resistente
231	10,88	Resistente
240	11,70	Resistente
241	<6	Resistente
244	12,74	Resistente
255	7,36	Resistente
303	27,17	Susceptible
309	25,76	Susceptible
322	11,88	Resistente
355	7,68	Resistente
370	28,22	Susceptible
380	13,75	Resistente
384	12,70	Resistente
409	19,17	Resistente

Dentro del manual M100: Estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos del CLSI 2021, se establece que mediciones del halo de inhibición ≤ 21 mm se consideran como un resultado positivo para la detección de resistencia a cefoxitina mediada por *mecA* en las cepas de *S. aureus*, mientras que mediciones ≥ 22 mm se interpretan como un resultado negativo. Aclarando esto, en el Cuadro 2 es posible notar que, de las 24 cepas clasificadas como MRSA por el equipo Vitek 2 en el estudio de Segura-Lobo 2020, 23 (95,83%) se identifican como resistentes a cefoxitina, con medidas del halo de inhibición que varían desde <6 hasta 19,17 mm, confirmando de esta manera por métodos fenotípicos certificados que son aislamientos correctamente denominados MRSA.

En cuanto a las cepas identificadas bajo el número de muestra 303 y 309, al tener halos de inhibición ≥ 22 mm (27,17 mm y 25,76 mm respectivamente) como se mira en el Cuadro 2 y según lo expuesto anteriormente, se pueden identificar como susceptibles a cefoxitina, siendo así aislamientos tipo MSSA, respaldando el resultado generado por el sistema automatizado Vitek 2.

Es importante resaltar que, de los 24 aislamientos previamente identificados como MRSA por el Vitek 2, únicamente uno (la muestra 370) presentó un halo de inhibición ≥ 22 mm (28,22 mm según se aprecia en el Cuadro 2), clasificándolo de esta forma como susceptible a cefoxitina y no como un aislamiento MRSA.

En la Figura 1 se muestra gráficamente la prueba de difusión en disco con cefoxitina llevada a cabo, donde se observa el halo de inhibición de las cepas utilizadas como control positivo (cepa MRSA) (A) y negativo (cepa MSSA) (B), en comparación con ejemplos de dos muestras (C y D) que, debido a la medición de sus halos, en el

Cuadro 2 se clasificaron como resistente y susceptible a cefoxitina (230 y 370 respectivamente).

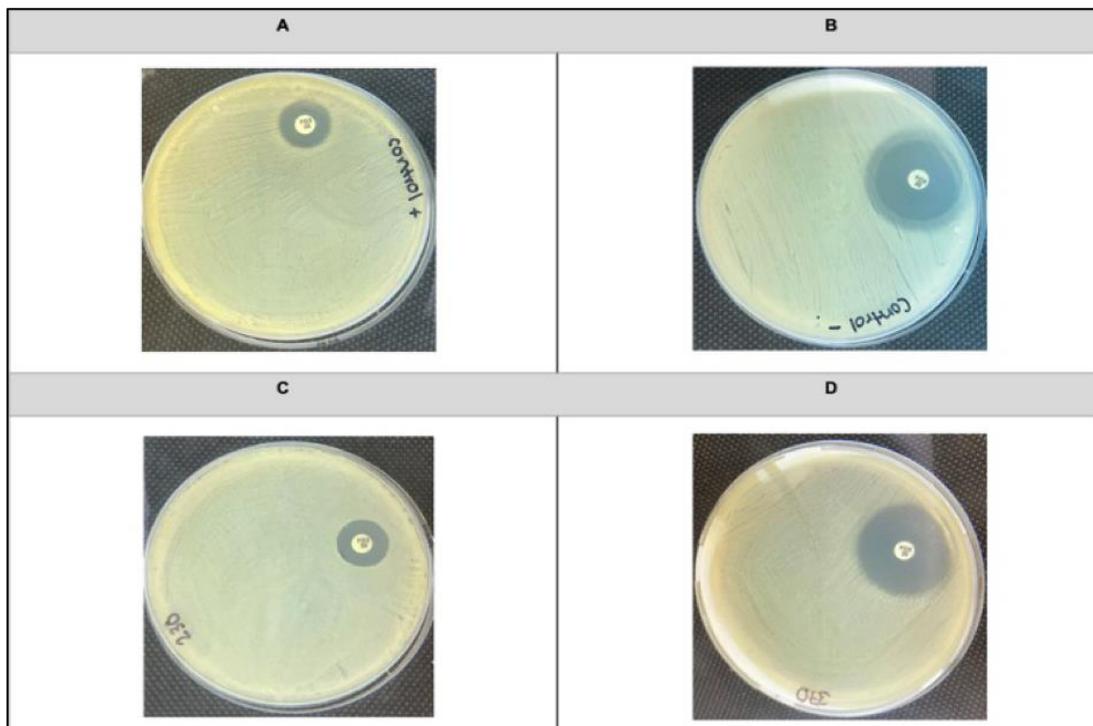


Figura 1.

Imagen de las pruebas de difusión en disco (Kirby-Bauer) para determinar la susceptibilidad de las cepas a cefoxitina. (A) Cepa de referencia S. aureus ATCC 43300 MRSA control positivo, halo de inhibición 14,02 mm; (B) Cepa de referencia S. aureus ATCC 25923 MSSA control negativo, halo de inhibición 25,41 mm; (C) Muestra 230, halo de inhibición 14,68 mm; (D) Muestra 370, halo de inhibición 28,22 mm.

Se comprueba por medio de la fotografía de la Figura 1 y de la medición realizada en el Cuadro 2 como la muestra 370, clasificada como MRSA por el resultado obtenido por el sistema Vitek 2 en el estudio de Segura-Lobo 2020, es realmente susceptible a la cefoxitina según esta prueba fenotípica avalada por el CLSI.

El uso de equipos automatizados para realizar identificación y pruebas de susceptibilidad a antibióticos de las bacterias es común en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Desde inicios de los 2000 se han realizado estudios donde el Vitek 2 ha sido altamente sensible y específico (94% y 100%, respectivamente) para la identificación de bacterias tipo MRSA (Felten et al. 2002). Sin embargo, para este tiempo el resultado se basaba únicamente en la MIC que se obtenía con oxacilina, y debido a esto algunas cepas hetero resistentes, podían ser erróneamente clasificadas como cepas MSSA (Felten et al. 2002). En consecuencia, los fabricantes adaptaron sus productos para optimizar la detección de resistencia mediada por *mecA*, ofreciendo paneles que incluyeran oxacilina y cefoxitina. De esta manera, cualquier aislamiento positivo en la prueba de cefoxitina se interpreta por los sistemas expertos de los instrumentos como resistente a oxacilina (Junkins et al. 2009).

En estudios más recientes se ha reportado una sensibilidad del 97,2% y una especificidad del 100% para el Vitek 2 en la detección de MRSA (Madhavan et al. 2021). En nuestro estudio, se determinó una sensibilidad y especificidad para el Vitek 2 del 100% y del 66,7%, respectivamente, debido a que los resultados obtenidos de la prueba de difusión en disco con cefoxitina concuerdan con los resultados dados por el Vitek 2, a excepción de la muestra 370, que fue erróneamente clasificada como MRSA por el Vitek 2. Sin embargo, cabe aclarar que la cantidad de datos es insuficiente para calcular estos parámetros de forma confiable. Este tipo de errores se han presentado en otros artículos, por ejemplo, en el estudio de Junkins y colaboradores 2009, un aislamiento MSSA demostró repetidamente ser resistente a oxacilina y susceptible

para cefoxitina en el sistema Vitek; sin embargo, el sistema experto interpretó el resultado como MRSA sobre la base del resultado obtenido con oxacilina. Así mismo, en el estudio de Acosta-Pérez y colaboradores 2012, cuatro cepas que de manera consistente habían sido negativas para la presencia del gen *mecA* por PCR y sensibles por la prueba de difusión con disco de cefoxitina, fueron mal clasificadas por parte del equipo Vitek 2 como MRSA.

Debido a su facilidad de uso, rapidez para obtener el resultado y rentabilidad, los sistemas automatizados a menudo son preferidos sobre los métodos manuales de referencia del CLSI, que requieren más tiempo, mano de obra y costo. Sin embargo, por este tipo de reportes de resultados inexactos, es importante realizar la confirmación de resultados de pruebas de susceptibilidad automatizadas con un método de referencia (Bobenchik et al. 2014; Madhavan et al. 2021; Rose et al. 2022).

En cuanto a los métodos fenotípicos manuales que recomienda el CLSI, hay varias razones por las cuales, en este estudio y en muchos otros artículos, se prefiere la prueba de difusión en disco con cefoxitina que los métodos que utilizan oxacilina. Antes del año 2005 la oxacilina era el agente recomendado por el CLSI para las pruebas fenotípicas por su estabilidad y sensibilidad, sin embargo, tanto los paneles de MIC como las placas de difusión en disco, eran difíciles de leer y debían ser examinadas cuidadosamente para detectar cualquier crecimiento que pudiera ser indicativo de resistencia. Por esto el CLSI se basó en un estudio de tres fases donde se evaluaba la utilidad de la cefoxitina para predecir la resistencia mediada por *mecA* en *Staphylococcus* para adoptar el uso de esta prueba en su Tabla 2C del manual M100. En este estudio se llegó a la conclusión de que la prueba de difusión en disco

con cefoxitina produce zonas de inhibición más fáciles de leer que no requieren luz transmitida para detectar resistencia y proporciona una detección equivalente (sensibilidad y especificidad) de la resistencia a la oxacilina en *S. aureus* (Swenson y Tenover 2005; CLSI 2012).

Además de la facilidad de leer los resultados obtenidos con cefoxitina, hay dos razones con más peso para su uso, esta prueba tiene la capacidad de detectar cepas atípicas que muestran resistencia heterogénea o críptica (Roisin et al. 2008). En 1991, Tomasz y col. describieron cuatro clases fenotípicas de resistencia según la MIC *in vitro* para meticilina, clasificando así a las cepas MRSA como: cepas heterogéneas clase 1, 2 y 3 y cepas homogéneas (Acosta-Pérez et al. 2012). La resistencia homogénea se detecta fácilmente con métodos de prueba estándar, mientras que la expresión heterogénea puede ser más difícil de detectar con algunos métodos (como los que utilizan oxacilina) porque solo una fracción de la población (por ejemplo, 1 de cada 10^4 ó 10^6 células) expresa el fenotipo de resistencia y por esto son erróneamente clasificadas como sensibles (Junkins et al. 2009; CLSI 2012; Madhavan et al. 2021).

La cefoxitina (una cefamicina), tiene una alta afinidad por la PBP4 (una de las proteínas de unión a penicilina de alto peso molecular de *S. aureus* a las que se unen los betalactámicos), y experimentos previos han demostrado una relación entre la PBP4, PBP2 y PBP2a (PBP4 y PBP2 funcionan cooperativamente para producir un peptidoglucano estafilocócico esencial para la supervivencia de la bacteria, en cepas MRSA la PBP2 es reemplazada por la PBP2a), por esto, la cefoxitina es un mejor inductor de la expresión del gen *mecA* y detecta mejor las poblaciones heterogéneas (que expresan de forma variable el gen) que la oxacilina, un inductor débil de la

producción de PBP2a (Cauwelier et al. 2004; Leski y Tomasz 2005; Memmi et al. 2008).

En cuanto a la resistencia críptica, se han descrito organismos crípticos resistentes a los antibióticos en *S. aureus*, como MRSA sensible a la oxacilina (OS-MRSA, por sus siglas en inglés), que portan el gen *mecA* o *mecC* pero muestran una concentración mínima inhibitoria de oxacilina en el rango sensible. Esto hace que sea más fácil malinterpretar OS-MRSA como MSSA mediante pruebas fenotípicas convencionales basadas en la susceptibilidad a la oxacilina (Liu et al. 2021). En el estudio de Liu y colaboradores 2021 se determinó que la prueba de difusión en disco de cefoxitina podía clasificar correctamente OS-MRSA y que representa una alternativa confiable y económica para evitar la identificación errónea de estos aislamientos.

Sumado a todo lo dicho, es importante tener en cuenta que, aunque el Vitek 2 presenta alta sensibilidad y especificidad y existen las pruebas fenotípicas manuales recomendadas por el CLSI, que pueden respaldar los resultados de sistemas automatizados, todos estos métodos son propensos a errores, excepto la detección del gen *mecA* por el método de PCR (Swenson y Tenover 2005), por esto mismo se decidió incluir la técnica en el presente estudio.

3.2 Determinación de la presencia del gen *mecA* mediante prueba de PCR

Para realizar la prueba de PCR es necesario llevar a cabo una extracción del material genético de las cepas. En este caso, antes de escoger el método de extracción final descrito en la metodología, se hicieron primeramente pruebas de extracción con

tres kits comerciales de marcas distintas: High pure FFPE DNA isolation kit (Roche, Lugar de origen: Basel, Suiza), Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Lugar de origen: Wisconsin, EE. UU.) y DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Lugar de origen: Hilden, Alemania).

Al efectuar mediciones de cantidad (Qubit 4 fluorometer (Thermo Scientific, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.)) y calidad (Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Lugar de origen: Massachusetts, EE. UU.)) del ADN extraído con estos kits, se determinó que con la marca comercial Roche se obtenían mejores resultados; sin embargo, la cantidad de ADN obtenida era baja y en cuanto a la pureza, presentaba relaciones de absorbancia 260/280 menores a 1,6 y 260/230 menores a 1,5. A la hora de realizar la amplificación, no se observaron en el equipo QIAxcel Advanced los amplicones esperados para la cepa utilizada como control positivo, ni para las cepas determinadas como MRSA por el método de difusión en disco con cefoxitina.

La pared celular de *S. aureus* está formada por una capa gruesa de peptidoglicano que contiene una amplia variedad de moléculas responsables de su rigidez y de perjudicar la lisis de la bacteria y la eficacia de los protocolos de extracción. Para debilitarla en una extracción de ADN lo que se recomienda utilizar es acromopeptidasa o lisostafina (Japoni et al. 2004; Chapaval et al. 2008; Maristela-Oliviera et al. 2018).

Los kits que se emplearon utilizaban lisozima (Promega), proteinasa K (Qiagen) y un buffer de lisis del cual no se especifican los componentes (Roche) para debilitar la pared. Como se expuso antes, estos no son los reactivos que se suelen recomendar.

En el caso de la lisozima, por ejemplo, se ha demostrado que *S. aureus* es completamente resistente a esta debido a la O-acetilación, catalizada por la O-acetiltransferasa A, del peptidoglicano. (Bera et al. 2005; Ablain et al. 2009). Estos mecanismos expuestos que posee *S. aureus* para resistir la lisis por tratamiento químico es una de las razones para la falta de ADN en buena cantidad y calidad para llevar a cabo la prueba PCR (Chapaval et al. 2008)

Además de los kits comerciales, la extracción de ADN de las bacterias se puede realizar utilizando un método convencional (métodos de ebullición, fenol-cloroformo y detergente) (Hassanzadeh et al. 2016). En este caso, al no obtener buenos resultados en la prueba PCR luego de varios intentos de extracciones utilizando el kit escogido, se optó por emplear el método de ebullición, una técnica que se puede realizar rápidamente, es simple, reproducible, de bajo costo, no se utilizan reactivos tóxicos y no es necesario un equipo sofisticado (Buzinhani et al. 2007; Queipo-Ortuño et al. 2008). Varios estudios con *S. aureus* han utilizado este método y lo han descrito como eficiente. Se puede obtener directamente ADN en cantidad y calidad suficientes para la PCR y se ha notado una mayor sensibilidad de la prueba cuando se utiliza este método (Japoni et al. 2004; Buzinhani et al. 2007; Chapaval et al. 2008; Montazeri et al. 2015; Parvez et al. 2018).

Como se explicó anteriormente en la metodología, se realizó una medición de la cantidad de ADN de dos de las cepas del estudio, una susceptible y otra resistente según la prueba de difusión en disco con cefoxitina (370 y 409, respectivamente) y de los controles positivo (cepa MRSA) y negativo (cepa MSSA) por medio del Qubit 4 fluorometer. Esto se realizó con el propósito de evaluar la extracción total del ADN

obtenido por el método de ebullición (Cuadro 3). Aunque la cantidad obtenida es baja, al realizar la prueba PCR sí se obtuvieron los amplicones esperados, contrario a lo sucedido cuando se utilizó el kit comercial para la extracción donde no se logró la amplificación.

Cuadro 3.

Medición de cantidad del ADN obtenido mediante el método de extracción por ebullición para la realización de la prueba PCR, obtenida con el equipo Qubit 4 fluorometer.

N° de muestra	Medición de cantidad de ADN en Qubit™ 4 fluorometer (ng/μL)
Control positivo (<i>S. aureus</i> ATCC 43300, MRSA)	0,105
Control negativo (<i>S. aureus</i> ATCC 25923, MSSA)	0,083
370	0,078
409	0,264

Para visualizar el ADN extraído de estas cuatro cepas a las que se les realizó la medición de cantidad, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1%; sin embargo, al ser la cantidad de ADN baja, no se logró visualizar en el gel. Para obtener los resultados del Cuadro 3, se utilizaron de una a diez colonias de los cultivos de las cepas para la extracción, por lo que, para poder observar el ADN en el gel, se decidió repetir el método aumentando la cantidad de colonias utilizadas en la extracción a más de 20 (se tomaba un pellet que fuera notable en la punta del asa bacteriológica).

Una vez repetido el método, se procedió a realizar una medición de cantidad y de esta manera se obtuvieron los resultados que se observan en el Cuadro 4, donde se puede apreciar un incremento en la cantidad de ADN extraído.

Cuadro 4.

Medición de cantidad del ADN obtenido mediante el método de extracción por ebullición para llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 1%, obtenida con el equipo Qubit 4 fluorometer.

N° de muestra	Medición de cantidad de ADN en Qubit™ 4 fluorometer (ng/μL)
Control positivo (<i>S. aureus</i> ATCC 43300, MRSA)	2,82
Control negativo (<i>S. aureus</i> ATCC 25923, MSSA)	4,68
370	4,84
409	2,70

Con este se realizó de nuevo la electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se pudo visualizar con éxito el resultado de la extracción por medio de ebullición utilizando el equipo ChemiDoc XRS System (Biorad, Lugar de origen: California, EE. UU.) (Figura 2).

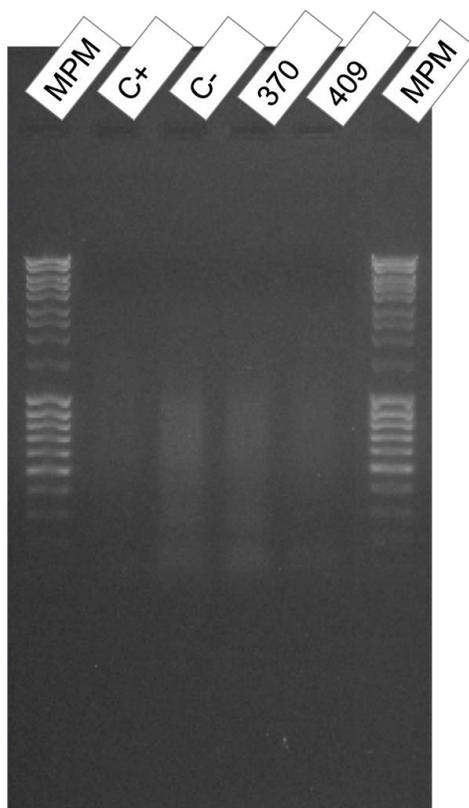


Figura 2.

*Fotografía del gel de agarosa al 1% luego del proceso de electroforesis para evaluar la extracción de ADN realizada a las cepas por medio del método de ebullición, obtenida con el equipo ChemiDoc XRS System. MPM: marcador de peso molecular. C+: Cepa de referencia *S. aureus* ATCC 43300 MRSA control positivo. C-: Cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 MSSA control negativo. 370: Muestra #370 determinada como susceptible. 409: Muestra #409 determinada como resistente.*

Aunque se comprueba que efectivamente se extrajo ADN de los aislamientos con este método, en la Figura 2 se muestra como el material genético obtenido está degradado, ya que, en vez de formar una banda, se observa una mancha de ADN.

Aunque la extracción por ebullición es conveniente y de bajo costo, queda algo de proteína residual con el ADN y la pureza de esta extracción es pobre (Hassanzadeh et al. 2016).

Aún con esta baja cantidad y pureza del ADN obtenido por el método de ebullición, sí se obtuvieron los amplicones esperados en la prueba de PCR, a diferencia de cuando se utilizaron los kits comerciales. Esto se explica de la siguiente manera, el éxito de la prueba PCR depende en gran medida de asegurar la ausencia de factores inhibitorios ya que, al ser una reacción enzimática, estos representan un inconveniente importante. Estos pueden originarse a partir de la muestra o introducirse durante el procesamiento de esta o la extracción del ácido nucleico. Esto incluye polvo de guantes, diferentes sales (cloruro de sodio o cloruro de potasio), detergentes o moléculas orgánicas (EDTA, etanol, alcohol isopropílico o fenol), que son necesarias para la lisis celular eficaz o para la preparación de ácidos nucleicos puros (Schrader et al. 2012; Maristela-Oliviera et al. 2018).

Al utilizar la marca de kit comercial Roche se obtuvo ADN en cantidades bajas, pero adecuadas para realizar la prueba de PCR; sin embargo, con el Nanodrop 2000 spectrophotometer se determinó que este presentaba relaciones de absorbancia 260/280 menores a 1,6 y 260/230 menores a 1,5; lo cual en la literatura ha sido asociado con presencia de compuestos aromáticos y contaminación con sales, carbohidratos y fenoles, los cuales pueden actuar como factores inhibitorios. De esta forma puede que se haya dado una inhibición parcial o total de la PCR resultando en una menor sensibilidad o resultados falsos negativos (Schrader et al. 2012; Banco Nacional de ADN Carlos III 2020).

En cuanto a la extracción por ebullición, los resultados positivos pueden deberse a que la prueba PCR y los cebadores utilizados fueron lo suficientemente sensibles para la detección, incluso con bajas concentraciones de ADN y los contaminantes presentes no actuaron como inhibidores de la PCR, ya que posiblemente el método los inactiva (Buzinhani et al. 2007; Maristela-Oliviera et al. 2018).

En las Figuras 3, 4 y 5 se pueden observar los resultados obtenidos luego de llevar a cabo la prueba PCR con el material genético obtenido de los aislamientos, cuando se realizó la extracción por ebullición utilizando de una a diez colonias del cultivo de cada cepa. Cada imagen contiene: (i) el marcador de peso molecular, necesario para medir el peso aproximado de las bandas que se amplificaron en cada cepa; (ii) los marcadores de alineación, para la calibración de la variación del tiempo de migración en todos los canales; (iii) el blanco, agua libre de nucleasas que se sometió a los mismos tratamientos que las cepas para verificar que no se diera ninguna contaminación en los procesos; (iv) los controles, para comprobar que en caso de las cepas MSSA no hubiera una amplificación y solo se detectara la presencia de los marcadores de alineación, mientras que en las cepas MRSA sí (un amplicon con un peso aproximado de 310 pb); y (v) las 26 muestras del presente estudio.

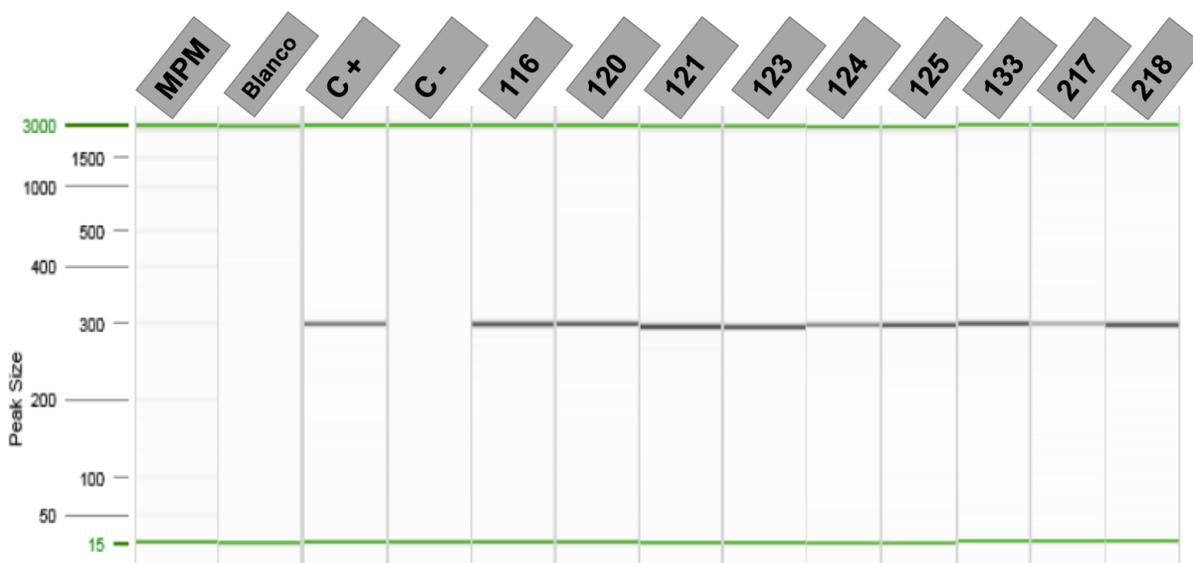


Figura 3.

Visualización de los amplicones obtenidos mediante la prueba de PCR en el equipo QIAxcel Advanced. MPM: marcador de peso molecular. Blanco: Agua libre de nucleasas. C+: Cepa de referencia *S. aureus* ATCC 43300 MRSA control positivo. C-: Cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 MSSA control negativo. 116-218: muestras utilizadas en el presente estudio. Líneas verdes: marcador de alineación.

En la Figura 3, todas las cepas incluidas (muestras 116-218) presentan un amplicon con el mismo peso molecular (310pb) que el control positivo (cepa MRSA), lo que indica la presencia del gen *mecA* y por lo tanto se confirma por el método de PCR que se trata de cepas MRSA con resistencia mediada por este gen. Lo mismo sucede en la Figura 4 con las muestras 230-138.



Figura 4.

Visualización de los amplicones obtenidos mediante la prueba de PCR en el equipo QIAxcel Advanced. MPM: marcador de peso molecular. Blanco: Agua libre de nucleasas. C+: Cepa de referencia *S. aureus* ATCC 43300 MRSA control positivo. C-: Cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 MSSA control negativo. 230-138: muestras utilizadas en el presente estudio. Líneas verdes: marcador de alineación.

En cuanto a la Figura 5, se puede notar que hay muestras que sí presentan un amplicon de peso similar al control positivo, como la 209, 322, 355, 380, 384 y 409, por lo tanto, al igual que en los casos anteriores, se clasifican como cepas MRSA por medio del método de PCR; y muestras como la 303, 309 y 370, que no presentan amplificación alguna a parte de los marcadores de alineación (como el control negativo), lo que confirma que no contienen en su material genético el gen *mecA* que media la resistencia en las cepas MRSA y por lo tanto se clasifican como cepas MSSA.

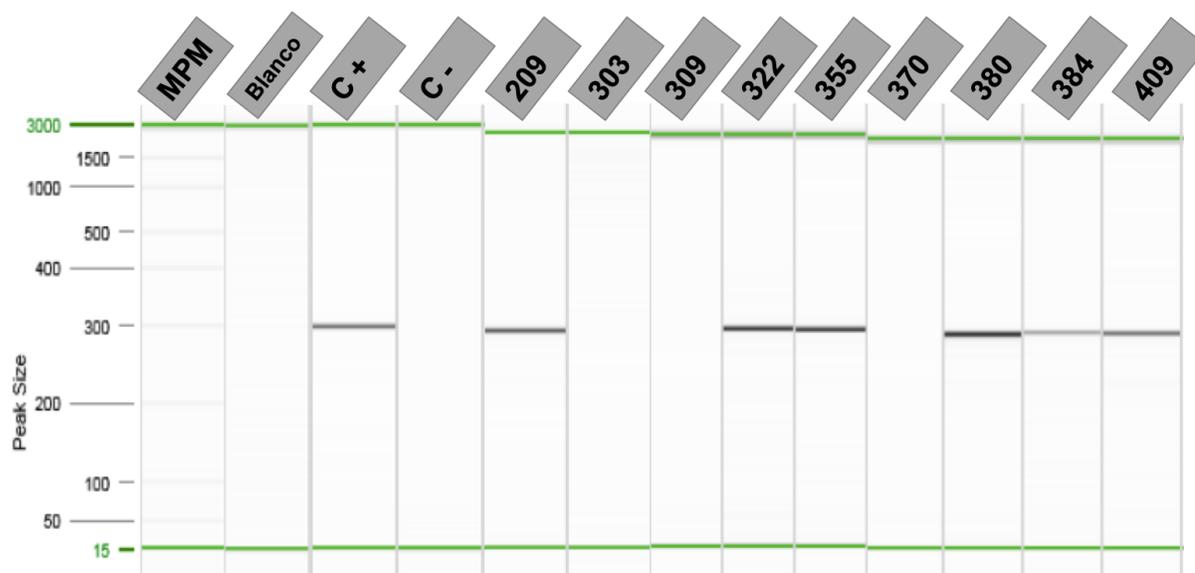


Figura 5.

Visualización de los amplicones obtenidos mediante la prueba de PCR en el equipo QIAxcel Advanced. MPM: marcador de peso molecular. Blanco: Agua libre de nucleasas. C+: Cepa de referencia *S. aureus* ATCC 43300 MRSA control positivo. C-: Cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 MSSA control negativo. 209-409: muestras utilizadas en el presente estudio. Líneas verdes: marcador de alineación.

Cabe mencionar que algunas de las bandas visualizadas poseen un color más oscuro que otras, esto es dependiente de la concentración de ADN que se obtuvo de cada aislamiento. Los aislamientos de los cuales se logró extraer mayor concentración de ADN generaron una banda de amplificación más intensa (QIAGEN 2017).

En este estudio los resultados obtenidos mediante la prueba de PCR concuerdan con los producidos por la prueba de difusión en disco con cefoxitina, esto demuestra que el método del disco de cefoxitina es fiable para la detección de cepas MRSA en ausencia de una técnica de PCR.

La Figura 6 evidencia, por medio de electroferogramas, los productos amplificados y su respectivo peso para el control positivo (cepa MRSA), el control negativo (cepa MSSA) y dos muestras del estudio que se identificaron como cepas MRSA y MSSA por medio de la prueba de PCR (muestras 322 y 309, respectivamente).

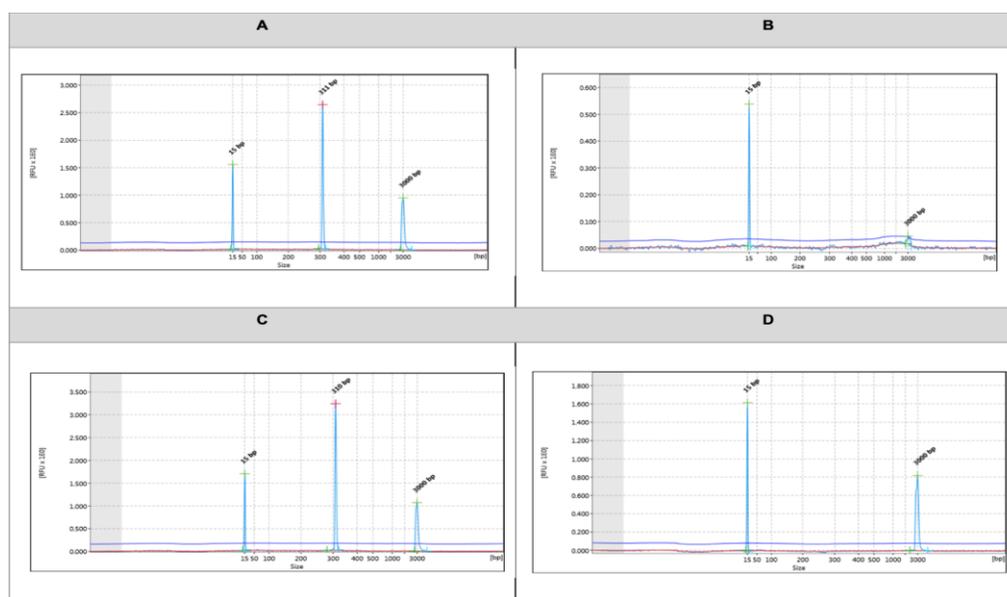


Figura 6.

Electroferogramas de los amplicones obtenidos mediante la prueba de PCR en el equipo QIAxcel Advanced. (A) Cepa de referencia S. aureus ATCC 43300 MRSA control positivo; (B) Cepa de referencia S. aureus ATCC 25923 MSSA control negativo; (C) Muestra #322; (D) Muestra #309.

Las cuatro cepas presentan dos amplificaciones que corresponden a los marcadores de alineación, con pesos de 15 y 3000 pb y en el caso del control positivo y la muestra 322, se puede observar una amplificación más, con un peso alrededor de 310 pb, lo que indica la presencia del gen *mecA*, al contrario del control negativo y la muestra 309.

A inicios del presente trabajo se comentó que existen diferentes métodos para identificación de MRSA; sin embargo, el CLSI comenta que entre los más definitivos están los que detectan específicamente el gen *mecA*. Dado que la resistencia a la meticilina se expresa de forma heterogénea en *S. aureus*, la detección de este gen mediante la prueba de PCR es el “estándar de oro” (Montazeri et al. 2015; CLSI 2021).

Varios estudios han demostrado que la prueba de difusión en disco cuenta con una sensibilidad y especificidad comparable a la prueba de PCR como el de Montazeri y colaboradores 2015. Más recientemente en el estudio publicado por Liu y colaboradores 2021 los resultados del ensayo de difusión en disco con cefoxitina se correlacionaron mucho con la prueba PCR del gen *mecA*, similar al presente estudio, además, se encontró que esta prueba presenta un 100% de especificidad y muestra una mayor sensibilidad (98,4%) en la detección de aislamientos positivos para *mecA* que equipos como el Vitek 2.

Aun así, la prueba de PCR siempre va a superar a los métodos manuales debido a que cuenta con una sensibilidad más alta, proporciona los resultados de manera más rápida y no se ve afectada por las condiciones físicas y químicas del cultivo de *S. aureus* (como los métodos manuales donde la expresión fenotípica de la resistencia a meticilina puede alterarse por la temperatura, pH y osmolaridad del medio, principalmente cuando se utiliza oxacilina) (Japoni et al. 2004; Montazeri et al. 2015).

Cabe recalcar que la detección de *mecA* por PCR, es una prueba que cuenta con algunas limitaciones que restringen su uso rutinario a laboratorios de referencia especializados y no a laboratorios de diagnóstico, como su alto costo, necesidad de

equipo, instalaciones adecuadas y personal capacitado; además, una de sus principales desventajas es que no detectará nuevos mecanismos de resistencia como los mediados por el gen *mecC*. Por estas razones es necesario seguir implementando un método fenotípico preciso, rápido y rentable para la detección de MRSA en la cotidianidad, como lo es la prueba de difusión en disco con cefoxitina (Boubaker et al. 2004; Acosta-Pérez et al. 2012; Madhavan et al. 2021).

4. CONCLUSIONES

1. Gracias al uso, tanto de una técnica fenotípica manual como una molecular, ambas avaladas por el CLSI, se logró confirmar la presencia de aislamientos tipo MRSA dentro de los aislamientos multirresistentes de *Staphylococcus aureus* almacenados en la bacterioteca.
2. Al realizar la prueba fenotípica de difusión en disco se logró determinar la resistencia a cefoxitina de 23 de los 24 aislamientos clasificadas como MRSA por el equipo Vitek 2, así como la susceptibilidad del aislamiento restante y de los 2 aislamientos clasificados como MSSA por el equipo Vitek 2, confirmando y corrigiendo de esta manera los resultados obtenidos durante el estudio de Segura-Lobo 2020.
3. En este estudio todas las cepas clasificadas como MRSA por la prueba de difusión en disco fueron positivas para la presencia del gen *mecA* en la prueba de PCR y todas las cepas clasificadas como MSSA fueron negativas para la presencia del gen.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que laboratorios de diagnóstico comprueben los fenotipos de resistencia obtenidos mediante el Vitek 2 con una prueba manual de difusión en disco con cefoxitina, esto debido a que esta prueba avalada por el CLSI presenta una sensibilidad más alta que el sistema automatizado Vitek 2, sus resultados se correlacionan con los obtenidos mediante la prueba de PCR y porque el uso de la prueba PCR es restringido a laboratorios especializados.
- Se sugiere utilizar pruebas fenotípicas manuales con cefoxitina, en lugar de oxacilina, debido a que esto proporciona la ventaja de disminuir falsos negativos cuando se presentan cepas con resistencia heterogénea o resistencia críptica.
- Se recomienda el uso de la prueba de PCR para determinar la presencia o ausencia del gen *mecA*, y de esta manera confirmar o descartar si se trata de una cepa MRSA, en los casos donde los resultados entre un sistema automatizado y una prueba fenotípica manual no concuerdan entre sí.
- Implementar la prueba de PCR para la identificación del gen *mecC* cuando se detecta resistencia contra cefoxitina con la prueba de difusión en disco, pero no se detecta el gen *mecA* mediante la prueba de PCR.
- Se aconseja evaluar los agentes para lisis del kit a utilizar y la posibilidad de realizar una purificación al material extraído antes de realizar la prueba PCR, esto debido a que el uso de kits comerciales que tienen éxito en la extracción de material genético de otras bacterias puede no funcionar para *S. aureus* por sus mecanismos para resistir la lisis, además pueden generar contaminantes que inhiban la prueba PCR. Sin embargo, cabe recalcar que la validación y

estandarización de los métodos de extracción de ADN no era un objetivo de este trabajo. Los métodos de extracción de ADN utilizados buscaban principalmente la obtención de una cantidad de ADN suficiente para la realización de la prueba PCR. El método de extracción de ADN por ebullición logró este objetivo de forma satisfactoria. El uso de kits para extracción en este trabajo no generó datos satisfactorios, pero su uso requiere un proceso formal de estandarización para determinar su utilidad para este fin. Esto no se realizó en este trabajo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. [Internet]. 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Estados Unidos. [citado el 22 de enero del 2021]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mrsa/index.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. [Internet]. 2020. About antibiotic resistance. Estados Unidos. [citado el 21 de enero del 2021]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. [Internet]. 2020. Biggest threats and data. Estados Unidos. [citado el 22 de enero del 2021]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. M02-A11 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 11 ed. ISBN 1-56238-782-0. Estados Unidos.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2021. CLSI supplement M100-ED31:2021 Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. ISBN 978-1-68440-105-5. Estados Unidos.

[WHO] World Health Organization. [Internet]. 2020. Antibiotic resistance. Estados Unidos. [citado el 18 de enero del 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

Ablain W, Hallier-Soulier S, Causeur D, Gautier M, Baron F. 2009. A simple and rapid method for the disruption of *Staphylococcus aureus*, optimized for quantitative reverse transcriptase applications: application for the examination of Camembert cheese. Dairy Sci. Technol. 89: 69-81.

Acosta-Pérez G, Rodríguez-Ábrego G, Longoria-Revilla E, Castro-Mussot M. 2012. Evaluación de cuatro métodos para la detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente de muestras clínicas en un hospital regional. Salud Pública de México. 54(1): 1-6.

Aires de Sousa M. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. Clinical Microbiology and Infection. 23(6): 373-380.

Al-Obaidi M, Suhaili Z, Desa M. 2018. Genotyping Approaches for Identification and Characterization of *Staphylococcus aureus*. In: Abdurakhmonov I, editor. Genotyping. Londres: IntechOpen. p. 85-106.

Arce-Villalobos M, González M, Alpizar B, Reyes E, Vargas E, Acedo I, Ramíraz F, Vásquez O, Jiménez M, Castro J, Robles A, Cardoze M, Díaz J, Arias L, Blanco K. 2020. Plan de acción nacional de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos Costa Rica 2018-2025. Costa Rica: Ministerio de Salud de Costa Rica.

Banco Nacional de ADN Carlos III. [Internet] 2020. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. España. [citado el 20 de abril del 2022]. Disponible en:

<https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>

Becker K, Schaumburg F, Fegeler C, Friedrich A, Köck R. 2017. *Staphylococcus aureus* from the german general population is highly diverse. Int.J.Med.Microbiol. 307: 21-27.

Becker K, van Alen S, Idelevich EA, Schleimer N, SeggewiB J, Mellmann A, Kaspar U, Peters G. 2018. Plasmid-Encoded Transferable *mecB*-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 24(2): 242-248.

Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Götz F. 2005. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology. 55(3): 778-787.

Bobenchik A, Hindler J, Giltner C, Saeki S, Humphries R. 2014. Performance of vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp. J Clin Microbiol. 52(2): 392-397.

Boubaker B, Abbes R, Abdallah H, Mamlouk K, Mahjoubi F, Kammoun A, Hammami A, Redjeb S. 2004. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection. 10(8): 762-765.

- Buzinhani M, Metifogo E, Timenetsky J. 2007. Detection of *Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma diversum* in cows with reproductive disorders. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59(6): 1368-1375.
- Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. 2004. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 23: 389-392.
- Cervantes-García E, García R, Salazar P. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio. 61(1): 28-40.
- Chapaval L, Moon D, Gomes J, Duarte F, Tsai S. 2008. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 60(2): 299-306.
- Felten A, Grandry B, Lagrange P, Casin I. 2002. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol. 40(8): 2766-2771.
- Gajdács M. 2019. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antibiotics. 8(2): 52-79
- Garzón J, Ramírez S, Muñoz L. 2019. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. NOVA. 17(32): 25-38.

- Haag A, Fitzgerald R, Penadés J. 2019. *Staphylococcus aureus* in animals. *Microbiology Spectrum*. 7(3): 731-746.
- Hassanzadeh S, Pourmand M, Afshar D, Dehbashi S, Mashhadi R. 2016. TENT: a rapid DNA extraction method of *Staphylococcus aureus*. *Iran J Public Health*. 45(8): 1093-1095.
- Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, Pourabbas B. 2004. Modified DNA extraction for rapid PCR detection of methicillin-resistant Staphylococci. *Iranian Biomedical Journal*. 8(3): 161-165.
- Jevons MP. 1961. "Celbenin"- resistant Staphylococci. *Br Med J*. 1: 125-125.
- Jiménez-Pearson A, Chaverri J, Pérez C, Ramirez M, Bolaños H, Grupo de trabajo de la Estrategia para la Vigilancia de Laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos en microorganismos de importancia en salud pública. 2020. "Informe técnico: Estrategia Vigilancia de laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos de microorganismos de importancia en salud pública, 2018". Tres Ríos, Costa Rica: Inciensa.
- Jiménez-Pearson A, Chaverri J, Pérez C, Ramirez M, Bolaños H, Grupo de trabajo de la Estrategia para la Vigilancia de Laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos en microorganismos de importancia en salud pública. 2020. Guía: Estrategia para la vigilancia de laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos de microorganismos de importancia en salud pública. Costa Rica: Inciensa.

- Jonas D, Speck M, Daschner F, Grundmann H. 2002. Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *Journal of clinical microbiology*. 40(5): 1821-1823.
- Junkins A, Lockhart S, Heilmann K, Dohrn C, Von Stein D, Winokur P, Doern G, Richter S. 2009. BD phoenix and vitek 2 detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* with cefoxitin. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(9): 2879-2882.
- Lee A, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra S, Peschel A, Harbarth S. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*. 4.
- Leski T, Tomasz A. 2005. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4 and PBP2A. *Journal of Bacteriology*. 187(5): 1815-1824.
- Liu J, Li T, Zhong N, Wang X, Jiang J, Zhang W, Tang R, Gou Y, Liu Y, Hu J, He L, Tang J, Wu W, Li M. 2021. Current status of oxacillin susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* infection in Shanghai, China: a multicenter study. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 54(6): 1070-1077.
- Madhavan A, Sachu A, Balakrishnan A, Vasudevan A, Balakrishnan S, Vasudevapanicker J. 2021. Comparison of PCR and phenotypic methods for

the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Iranian Journal of Microbiology. 13(1): 31-36.

Maristela-Oliviera L, Thabata L, Evanguedes K, Thomasini R, Machado C. 2018. Comparison of five methods of extraction of *Staphylococcus aureus* DNA for molecular detection by PCR. Rev Soc Bras Med Trop. 51(4): 528-532.

Memmi G, Filipe S, Pinho M, Fu Z, Cheung A. 2008. *Staphylococcus aureus* PBP4 is essential for beta lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 52(11): 3955-3966.

Mizusawa M, Carroll K. 2020. Novel strategies for rapid identification and susceptibility testing of MRSA. Expert Review of Anti-infective Therapy. 18(8): 759-778.

Monson L, Nielsen L. 2019. Staphylococci. In: Mahon C, Lehman D, editores. Textbook of Diagnostic Microbiology. Missouri: ELSEVIER. p. 307-321

Montazeri E, Khosravi A, Jolodar A, Ghaderpanah M, Azarpira S. 2015. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR. Burns. 41(3): 590-594.

Moodley A, Nightingale EC, Stegger M, Nielsen SS, Skov RL, Guardabassi L. 2008. High risk for nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Danish veterinary practitioners. Scand J Work Environ Health. 34:151-7

- Morris D, Loeffler A, Davis M, Guardabassi L, Weese J. 2017. Recommendations for approaches to methicillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures. *Veterinary Dermatology*. 28(3): 304-330.
- Neradova K, Jakubu V, Pomorska K, Zemlickova H. 2020. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary professionals in 2017 in the Czech Republic. *BMC Veterinary Research*. 16(4).
- Parvez M, Ferdous R, Rahman M, Islam S. 2018. Healthcare-associated (HA) and community-associated (CA) methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Bangladesh- source, diagnosis and treatment. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16(2): 473-478.
- Peton V, Le Loir Y. 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infection, Genetics and Evolution*. 21: 602-615
- Pollitt E, Szkuta P, Burns N, Foster S, Prince A. 2018. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLOS Pathogens*. 14(6): 1-26.
- QIAGEN. 2017. QIAxcel advanced user manual. HB-0804-010. Hilden, Alemania.
- Queipo-Ortuño M, Colmenero J, Macias M, Bravo M, Morata P. 2008. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin Vaccine Immunol*. 15(2): 293-296.

- Roisin S, Nonhoff C, Denis O, Struelens M. 2008. Evaluation of new vitek 2 card and disk diffusion method for determining susceptibility of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(8): 2525-2528.
- Rojas-Núñez I. 2014. Prevalencia y caracterización fenotípica y molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en superficies de contacto humano y animal en el Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica, durante los meses de mayo y junio del año 2013. Heredia, CR: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional.
- Rose D, Moskhos A, Wibisono A, Reveles K. 2022. Automated susceptibility testing with vitek 2 compared to microscan reduces vancomycin alternative therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *International Journal of Infectious Diseases*. 117: 179-186.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. 2012. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*. 113(5): 1014-1026.
- Segura-Lobo NM. 2020. Estudio exploratorio descriptivo sobre la exposición laboral a *Staphylococcus aureus* y la percepción a los riesgos biológicos presentes en las actividades que desempeñan los trabajadores y estudiantes en la escuela de medicina veterinaria de la universidad nacional de costa rica. Heredia, CR: Tesis (Magíster Scientiae) Universidad Nacional.

- Suárez C, Gudiol F. 2009. Antibióticos betalactámicos. Enfermedades infecciosas y microbiología médica. 27(2): 116-129.
- Suárez-López G, Ramírez H, Ureña M, Fernández H, Alpízar B. 2018. Plan estratégico y operacional pecuario de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos 2017-2022. Costa Rica: Senasa.
- Swenson J, Tenover F. 2005. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol. 43(8): 3818-3823.
- Turner N, Sharma B, Maskarinec S, Eichenberg E, Shah P, Carugati M, Holland T, Fowler V. 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. Nature Reviews Microbiology. 17: 203-218.
- Ventola C. 2015. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. Pharmacy and Therapeutics. 40(4): 277-283.
- Wertheim H, Melles D, Vos M, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh H, Nouwen J. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect. Dis. 5: 751-762.
- Widen R, Tang Y. 2018. Advanced Methods for Screening and Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: Tang Y, Stratton C, editores.

Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology: Volume 2: Applications.
Nueva York: Springer. p. 187-198.

Wulf MWH, Sørnum M, van Nes A, Skov R, Melchers WJG, Klaassen CHW, Voss A.
2008. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among
veterinarians: an international study. Clin Microbiol Infect. 14:29–34.