

Artículo de revisión

Evolución de la resistencia en el *Staphylococcus aureus*.

Evolution of resistance in *Staphylococcus aureus*

Biol. Gabriela Sanabria. Departamento de Investigación y Docencia del IMT. Asunción – Paraguay

Introducción

En el siglo XIX Pasteur dijo: *C'est les microbes qui auront le dernier mot?* (¿Serán los microbios los que tendrán la última palabra?) (1).

Debido a su gran velocidad de reproducción, facilidad de análisis en laboratorio y la amplia diversidad que se puede obtener de mutantes generados en laboratorio, las bacterias se han descrito como un excelente modelo para estudiar el proceso de la evolución (1).

Con frecuencia la evolución se describe meramente como "cambio" o "cambio en frecuencia de los genes a lo largo del tiempo" (2-4), y los evolucionistas han mantenido casi universalmente que cualquier cambio en el genotipo (o incluso en el fenotipo) es un "cambio evolutivo". Como tal, cualquier cambio biológico en un organismo, incluyendo la resistencia a los antibióticos, concordaría con esta definición (5).

La historia evolutiva de los cambios en la resistencia del *S. aureus* se inicia en la década del 40 donde se reportan tasas de mortalidad por bacteremia causadas por este germen del 82% en USA (5) y la introducción de enzilpenicilina en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas con gran éxito hasta mediados de los años 50 donde el número de muestras de *S. aureus* aislados de hemocultivos en hospitales mostraban altos niveles de resistencia a la penicilina. Este mecanismo de resistencia involucra la adquisición de un plásmido capaz de degradar el antibiótico antes de que sea capaz de llegar a la célula blanco. Así en 1959 con la introducción de la metilicina para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* resistentes a la penicilina parecía dar un respiro en cuando al fracaso en el tratamiento hasta la década del 60 en donde se reportan los primeros casos de *S. aureus* resistentes a la metilicina (SAMR) en Europa (6).

Las bases de la meticilino resistencia están dadas por el gen *mec A* que codifica la PBP (proteína ligadora de penicilina) 2-a, la cual confiere resistencia a todos los β -lactámicos.

En la actualidad se conocen aproximadamente cinco mil antibióticos, de los cuales mil se estudiaron en profundidad, llegando sólo cien al uso clínico para el tratamiento de infecciones (7).

El propósito de este reporte no es detallar los mecanismos moleculares de resistencia del *S. aureus* sino revisar su rol como comensal y patógeno humano, revisar los factores que contribuyen a la patogénesis y al incremento de la resistencia en esta bacteria y revisar los avances en estudios de epidemiología molecular del SAMR.

Desafíos al cual nos enfrentamos

En el amplio espectro de acción del *S. aureus* es importante considerar el número creciente de pacientes inmunocomprometidos en los cuales la terapia antibiótica pierde efectividad, la aparición de nuevos patógenos y la reaparición con mayor virulencia de otros ya conocidos y la incrementada resistencia bacteriana a los antibióticos en contexto global.

Las enfermedades infecciosas constituyen por su frecuencia uno de los apartados más importantes en Pediatría y, dentro de este campo, la antibioterapia es el avance más importante (8) y el *Staphylococcus aureus* el patógeno más importante causante de enfermedades dentro del ámbito hospitalario y cada vez con más frecuencia en el ámbito comunitario.

La resistencia bacteriana

La aparición de resistencia se produce por dos factores fundamentales: **a.-** La existencia de genes determinantes de la aparición de un mecanismo de resistencia, que pueden ser transferidos entre células bacterianas de una misma cepa o cepas diferentes, convirtiendo la resistencia en un fenómeno transferible, y **b.-** El uso amplio de antibióticos que ejercen una presión de selección que favorece la supervivencia de cepas que portan y expresan genes determinantes de resistencia.

La resistencia puede, en consecuencia originarse en mutaciones al azar de genes localizados en los cromosomas o en sitios extracromosómicos como los plásmidos, que confieren resistencia (es decir un fenómeno primario no relacionado con el uso previo de un antibiótico), o como consecuencia del uso repetitivo y extendido de un determinado compuesto (9).

Las mutaciones pueden ser sólo cambios microevolutivos, es decir que comprometen un par de nucleótidos en la estructura del DNA, mientras que los macroevolutivos involucran grandes segmentos del mismo incluyendo inversiones, duplicaciones, inserciones, deleciones y transposiciones. Es decir

que pueden existir mutaciones de genes preexistentes o adquisición de nuevos genes. Cuadro 1.

Cuadro 1. Principales antibióticos a los que se ha encontrado resistencia en cepas de *S. aureus*

Antibiótico	Genes de resistencia	Producto del gen	Mecanismo de resistencia	Localización
Penicilina	<i>blaZ</i>	β -lactamasa	Hidrólisis enzimática del núcleo β -lactámico	Plásmidos; Tn552
β -lactámicos	<i>mecA</i>	PBP2a	Afinidad reducida al antibiótico	Cromosoma SSC-mec; Tn4291
Aminoglucósidos	<i>aacA-aphD</i>	Acetiltransferasa, Fosfotransferasa	Modificación por acetilación o fosforilación	Cromosoma; plásmidos; Tn4001, Tn5404, Tn5405
Macrólidos, lincosamidas	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i>	Metilasa	Metilación del rRNA 23S	Plásmidos; Tn554
Macrólidos, estreptograminas	<i>msrA</i> , <i>vha</i> , <i>vat</i> , <i>vatB</i>	Acarreadores ABC, Acetiltransferasa	Bomba de expulsión. Modificación por acetilación	Plásmidos
Tetraciclinas	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i>	Sistemas clase K, L y M	Bombas de expulsión. Protección ribosomal	Plásmidos, Tn916
Rifampicina	<i>rif</i>	RNA polimerasa	Mutación en la subunidad β de la RNA polimerasa	Cromosoma
Ácido fusídico	<i>fusA</i> , <i>fusB</i>	Factor de elongación G	Alteración del factor de elongación G	Plásmidos
Quinolonas	<i>par</i> <i>gyrA</i> o <i>gyrB</i>	Componente ParC de la topoisomerasa IV Componentes GyrA o GyrB de la girasa	Mutación en la subunidad A de la girasa y topoisomerasa IV	Cromosoma
Mupirocina	<i>mupA</i>	Isoleucil tRNA sintetasa	Producción de una Isoleucil tRNA sintetasa modificada	Plásmidos
Trimetoprim-sulfametoxazol	<i>dfrA</i> <i>sulA</i>	Dehidrofolato reductasa (DHFR) Dehidropteroato sintasa	Afinidad reducida de la DHFR. Sobreproducción de ácido <i>p</i> -aminobenzoico	Cromosoma Cromosoma, Tn4003
Glicopéptidos	<i>van</i>	Peptidoglicano alterado D-Ala-D-Lac	Se atrapa la vancomicina en la pared celular. Síntesis de un dipéptido que reduce la afinidad de la vancomicina	Cromosoma; Plásmidos; Tn1546
Oxazolidinonas	<i>rrn</i>	rRNA 23S	Mutación en el dominio V del rRNA 23S, interfiere con la unión ribosomal	Cromosoma
Quinupristina-dalfopristina (Q-D)	Q: <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> D: <i>vat</i> , <i>vatB</i>	Metilasa ribosomal Acetiltransferasa	Reduce la afinidad a la subunidad ribosomal 23S. Modificación enzimática de la dalfopristina	Cromosoma; plásmidos Plásmidos
Cloramfenicol	<i>cat</i>	rRNA 50S	Modificación por acetiltransferasa	Plásmidos
Fosfomicina	<i>fosB</i>	Glutación-S-Transferasa	Modificación en la síntesis de N-acetil murámico.	Plásmidos

Transferencia horizontal de genes

En muchas bacterias, esta transferencia de genes de resistencia es frecuente (10, 11), y da cuenta de muchos casos de resistencia en las bacterias. Sin embargo, la transferencia horizontal involucra meramente la transferencia de genes de resistencia que ya existen en el mundo de las bacterias.

La transferencia horizontal en el *S. aureus* es posible gracias a los genes *ccr*. Éstos se encuentran en *SCCmec* y codifican proteínas que catalizan la escisión precisa y la integración sitio específica del gen *mec* en el cromosoma de *S. aureus*. En el caso particular del *S. aureus*, algunos autores piensan que esta transferencia ocurre poco, por lo que las cepas de *S. aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad (CA-MRSA) son consecuencia de uno de estos raros eventos de transferencia del gen *mec*, de un donador a un receptor susceptible (12, 13)

Mutaciones

Las mutaciones, que se definen como cualquier cambio en la secuencia del ADN (14), proporcionan el único mecanismo genético conocido para la producción de nuevas actividades y funciones genéticas en el mundo biológico. En presencia de un antibiótico determinado (o de otros microbicidas), cualquier mutación que proteja a la bacteria de la cualidad letal de dicho compuesto presenta evidentemente un fenotipo «beneficioso». La selección natural seleccionará de manera enérgica y bastante precisa aquellos mutantes resistentes, lo que se ajusta al marco de una respuesta adaptativa. Pero el análisis molecular de dichas mutaciones revela una gran incongruencia entre la verdadera naturaleza de la mutación y las demandas de la teoría de la evolución.

Mecanismos de resistencia

El elemento central de la resistencia a la meticilina en *S. aureus* es la adquisición horizontal del gen *mecA*, el cual se encuentra en un elemento genético móvil grande, conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* ("staphylococcal cassette chromosome *mec*", *SCCmec*). Este casete no es endógeno de esta bacteria y se encuentra integrado en el cromosoma. El gen *mecA* codifica para una proteína de unión a la penicilina (PBP) de 78 kDa, llamada PBP2a, la cual presenta baja afinidad para la meticilina y todos los antibióticos β -lactámicos que se han desarrollado, incluyendo las isoxazolidinonas penicilinas (por ejemplo, la oxacilina). La proteína PBP2a continúa sintetizando peptidoglicano para la pared celular aun cuando las PBP normales estén inhibidas por los antibióticos (15-18) *SCCmec* es una isla genómica (Gisland), que se inserta al final del extremo 3' de un marco de lectura abierta ("open reading frame", ORF), denominado *orfX*, en un sitio único (*attB_{SCC}*), cerca del origen de replicación de *S. aureus*. *SCCmec* contiene el conjunto de genes *mec* (el gen *mecA* y sus reguladores) y el conjunto de genes *ccr* (19)

Existen cuatro clases genéticas del complejo del gene *mec* (A-D). En *S. aureus* sólo se han encontrado las clases A y B. La C se encuentra en *S. haemolyticus* y la D en *S. hominis*. La clase original, clase A, contiene dos genes intactos *mecI* y *mecR1*, así como el gen *mecA*. El gen *mecI* codifica una proteína represora de la transcripción: MecI. El gen *mecR1* codifica una proteína de transducción de señal: MecR1. Las proteínas MecI y MecR1 regulan la transcripción inducible de *mecA* (20) Cuadro 2.

Cuadro 2. Características de los diferentes tipos de casete cromosomal *SCCmec*.

	Peso molecular kb	Clase <i>mec</i>	<i>mecA</i>	<i>mecR1</i>	<i>mecI</i>	Tipo <i>ccr</i>	Lugar y año de aislamiento
Tipo I	34	B	++	$\Delta \ddagger$	- †	1	Reino Unido, 1961 en cepas MRSA
Tipo II	52	A	+	+	+	2	Japón, 1982 en cepas MRSA
Tipo III	66	A	+	+	+	3	Nueva Zelanda, 1985 en cepas MRSA
Tipo IV	20-24	B	+	Δ	-	2	EUA, 2002 en una clona pediátrica y en cepa CA-MRSA
Tipo V	28	C	+	Δ	-	C	Australia, 2004 en cepa CA-MRSA

* presencia del gen; † ausencia del gen; ‡ delección en el extremo 3' del gen

Bustos-Martínez, JA., Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas, M.

Si analizamos los mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos encontramos que en el caso de la vancomicina la resistencia se debe a la adquisición del gen *van*, el cual se transfiere a través de un plásmido.

La rifampina inhibe la transcripción bacteriana interfiriendo con la actividad normal de la ARNpolimerasa (21, 22). Esta mutación altera de forma suficiente la estructura de la subunidad β de modo que pierde especificidad para la molécula de la rifampina. Como resultado, la ARN-polimerasa deja de tener afinidad por la rifampina, y ya no queda afectada por el efecto inhibitor del antibiótico.

La resistencia espontánea a las fluoroquinolonas (como la ciprofloxacina o la norfloxacina) es también una mutación frecuente en algunas bacterias. La diana primaria del antibiótico es el enzima ADN-girasa, que está formado por dos proteínas codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* (23).

También la resistencia a la estreptomicina puede proceder de mutaciones bacterianas espontáneas. En este caso, la estreptomicina bloquea la síntesis de proteína de la bacteria aparentemente uniéndose con el segmento del ARNr 16S del ribosoma e interfiriendo con la actividad del ribosoma (24, 25). La resistencia al antibiótico puede surgir por mutaciones en el gen ARNr 16S, que

reduce la afinidad de la estreptomicina para la molécula 16S (26). La reducción de unas actividades de transporte específicas de oligopéptidos lleva también a una resistencia espontánea frente a diversos antibióticos, incluyendo la estreptomicina (27).

En otros ejemplos, la resistencia a la eritromicina puede también originarse debido a la pérdida de un segmento de once pares de bases del gen ARNr 23S (28), o por una mutación que altera la conformación del ARNr 23S—lo que reduce la afinidad del ribosoma hacia el antibiótico (29, 30). La resistencia al cloranfenicol se obtuvo por delección de una región de 12 pares de bases en el dominio II del gen de la peptidiltransferasa (31). La resistencia a las cefalosporinas se ha vinculado con una gran alteración de la cinética del transporte en membranas que es semejante a las estirpes deficientes en porinas (32). La resistencia a la actinonina en el *Staphylococcus aureus* resulta de mutaciones que eliminan la expresión del gen *fmt* (33).

Un aumento en la resistencia al meropenem y a la cefepima va también asociado a la pérdida de OmpF y de otra porina, OmpC (34).

La adquisición espontánea de resistencia a los antibióticos es designada con frecuencia como una «ganancia» de resistencia, pero es más apropiado identificarlo como una pérdida de sensibilidad.

Los mecanismos de acción de los antimicrobianos se resume como sigue: (35)

- Betalactámicos y glucopéptidos: inhiben la síntesis de la pared celular.
- Aminoglicósidos, macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas: inhiben la síntesis proteica al alterar la función de los ribosomas.
- Fluoroquinolonas: inhiben la síntesis del ADN
- Trimetoprima/sulfametoxazol (TMP/SMZ): actúan en el citoplasma e interfieren, entre otras con la síntesis del ácido tetrahidrofólico.
- Polimixinas: Interfieren con la membrana citoplasmática

Cuadro 3. Mecanismos de resistencia identificados en *S. aureus*

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

Velázquez-Meza ME

Factores de Virulencia

Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa.

Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina (36).

Los factores de virulencia de *S. aureus* nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped. En base a esto los factores se han clasificado en tres categorías:

- 1) los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa;
- 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Pantone-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares;
- 3) los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ (37, 38). Cuadro 4.

Las enterotoxinas estafilocócicas, forman parte del grupo de toxinas conocidas como superantígenos toxina pirogénicos (PTSAs), SEA a SEE, de SEG a J, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO (39).

Cuadro 4. Principales factores de virulencia de *S. aureus*

Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglicano	Catalasa	Toxina α (Hemolisina α)
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina β Hemolisina γ Hemolisina δ
Factores de Adhesión	Lipasas	Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL)
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Enterotoxinas estafilocócicas (SE)
Polisacáridos capsulares	Nucleasas	Toxina 1 del Sx. de shock tóxico (TSST-1)
	Proteasas	Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)
	Estafilocinasa	
	Colagenasa	

Bustos-Martínez, JA., Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas, M.

La toxina 1 del síndrome del shock tóxico de *S. aureus* suprime la quimiotaxis de neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema reticuloendotelial.

La leucocidina de Pantone-Valentine (PVL) ocurre en menos del 5% de las cepas de *S. aureus*. La leucocidina es citotóxica para los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del humano. forma poros en la membrana plasmática de los leucocitos, lo cual provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula (40).

La toxina α o hemolisina α , es considerada como el prototipo de las citotoxinas formadoras de poros, los monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células endoteliales capaces de lisar las células eucariontes.

El efecto final en el hospedero es el edemapulmonar o síndrome de dificultad respiratoria. La toxina α es dermonecrótica y neurotóxica y puede ser letal para ciertos animales (41, 42).

La hemolisina β tiene actividad de fosfolipasa c , la cual es específica para la esfingomielina y liso-fosfatidilcolina.

La hemolisina γ afecta a neutrófilos, macrófagos y a una gran variedad de eritrocitos de mamíferos. La hemolisina δ es capaz de causar daño en la membrana de un gran número de células de mamíferos. El 97% de las cepas de *S. aureus* produce hemolisina δ capaz de hidrolizar eritrocitos, además tiene actividad dermonecrótica.

Otros genes como los de la PVL, se localizan en bacteriofagos lisogénicos. Actualmente en nuestro centro se reporta una resistencia a la penicilina de más del 90% en cepas de *S. aureus* aisladas de hospitales y de la comunidad.

En los Estados Unidos son responsables del 60% de las bacteriemias nosocomiales (43) y en el Reino Unido, la incidencia de tales bacteriemias creció de 5.3/1000 a 33.2/1000 admisiones hospitalarias entre 1985 y 1996. (44).

Clonas de *S. aureus*

Los procedimientos de tipificación pueden jugar un papel importante en el diagnóstico y el manejo de las infecciones estafilocócicas. La epidemiología global requiere una colección de cepas de gran tamaño representativa de todos los SAMR que circulan en diferentes áreas geográficas y en diferentes periodos (45). Así que en un estudio realizado con 3000 cepas de *S. aureus* que incluyó a aislamientos de Europa, América Latina, USA, Japón, Taiwán, China y los primeros aislamientos del SAMR recuperados en Dinamarca e Inglaterra (46, 47, 48) demostró la existencia de cinco clonas a saber: Clona Ibérica, (49-52), Clona Brasileña, (53-55) Clona Húngara, (56-58) Clona Nueva York/Japón, (59-62) y Clona Pediátrica. (61, 64). Cuadro 5.

En el año 2001 se publicaron los primeros trabajos moleculares para la determinación de las clonas del SAMR en América Latina y se encontró que la Clona Brasileña multirresistente estuvo presente en 79% de los 494 SAMR estudiados (54). En este mismo estudio se observó la presencia de la clona M, presente solamente en los aislamientos de México (45); la Clona de Brasil, predominante en Argentina, Chile y Uruguay, no se identificó en nuestro país (45). Un estudio llevado a cabo durante un periodo de siete años, demostró la presencia de la clona del SAMR (Nueva York/Japón) circulando en aislamientos

mexicanos, así como el desplazamiento durante cinco años de la clona M actual (41).

Cuadro 5. Distribución de las principales clonas de *S. aureus* meticilino resistentes

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

Velázquez-Meza ME

El futuro

Ante este oscuro panorama de multirresistencia en rápido desarrollo y no habiéndose producido la aparición de grupos nuevos de antibióticos en más de treinta años, más allá del desarrollo de técnicas generales de control de infecciones, la investigación farmacológica se ha encaminado hacia la obtención de nuevos agentes y el mejoramiento de grupos de antibacterianos existentes. En este sentido, las fluoroquinolonas han sido el grupo más investigado (3).

En los últimos años ha aparecido un nuevo grupo de estas drogas denominadas por su espectro "fluoroquinolonas respiratorias".

Referencias

1. Dixon B: Power unseen: how microbes rule the world. New York: WH Freeman, 1994; 98-101
2. Hoel D, Williams DN: Antibiotics: Past, present, and future. Postgrad. Med. 1997; 101: 114.
3. Greca A, La resistencia bacteriana y los nuevos antibioticos. VI Jornadas Internacionales de Medicina Interna-X Jornadas de Medicina Interna del Litoral Argentino Enfermedades Regionales. 2000.
4. Pineda-Solas V. USO correcto de los antibióticos en pediatría. Servicio de Pediatría, Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell. 2007
5. Carter, A.P., Clemmons, W. M. Brodersen, D.E. Morgan-Warren, R.J. Wimberly, B.T. y Ramakrishnan. V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interaction with antibiotics. Nature 2000. 407:340-348.
6. Chevalier, J., Pagès, J.-M. y Malléa. M. In vivo modification of porin activity conferring antibiotic resistance to Enterobacter aerogenes. Biochemical and Biophysical Research Communications 1999. 266:248-251.
7. Dillon, L.S. Evolution: concepts and consequences, C.V. Mosby, St. Louis, MO. 1978.

8. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK et al.: Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals. A three year analysis. Clin. Infect. Dis. 1999; 29: 239-244.
9. Crowe M, Ispahani P, Humphreys H et al.: Bacteraemia in the adult intensive care unit of a teaching hospital in Nottingham UK, 1985-1996. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1998; 17: 377-384.
10. Brezzo C, Cecchini D, Biscione F, y col. Enfermedad invasora por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirida en la comunidad. Medicina (Buenos Aires) 66: 443-6, 2006.
11. Douthwaite, S. Functional interactions within 23S rRNA involving the peptidyltransferase center. Journal of Bacteriology 1992. 174:1333-1338.
12. Douthwaite, S., Prince, J.B. y Noller. H.F. Evidence for functional interaction between domains II and V of 23S ribosomal RNA from an erythromycin-resistant mutant. Proceedings of the National Academy of Science 1985. 82:8330-8334.
13. Gale, E.F., Cundliffe, E. Reynolds, P.E. Richmond, M.H y Waring. M.J. The Molecular Basis of Antibiotic Action. John Wiley & Sons, New York. 1981.
14. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud Pública Méx 2005; 47:381-7.
15. Schmitt CK, Meysick KC, O'Brien AD. Bacterial toxins: friends or foes? Emerg Infect Dis 1999; 5:224-34
16. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13:16-34.
17. Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* "superbug". J Clin Invest 2004; 114:1693-6.
18. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2001; 9:486-93.
19. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis 2001; 7:178-82.
20. Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicro Agents Chemother 2002; 46:1147-52
21. Hussain, F. M., Boyle-Vavra, S., Bethel, C. D. & Daum, R. S. Pediatr. Infect. Dis. J. 2000. 19, 1163-1166
22. Dominquez MA, Pujol M. Cambios en la epidemiología de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Recomendaciones para el control de su dimeminación. J Clin Microbiol 2000; 32:281-287.
23. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud Publica Mex 2005;47:381-387.
24. Gómez, L.R. Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. International Microbiology 1998. 1:279-284.
25. Gregory, S.T., y A.E. Dahlberg. Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA. Journal of Molecular Biology 1999. 289:827-834.
26. Hooper, D.C., y Wolfson. J.S. Quinoline Antimicrobial Agents. ASM Press, Washington, DC. 1993.

27. Hooper, D.C., Wolfson, J.S. Nigel, E. Y. Y Swartz M. N. Mechanisms of action and resistance to ciprofloxacin. American Journal of Medicine 1987. 82:4A:12–20.
28. Johnson, G.B. The Living World. McGraw-Hill, New York. 2000.
29. Kashiwagi, K., M.H. Tshako, K. Sakata, T. Saisho, A. Igarashi, S.O.P. daCosta, y K. Igarashi. Relationship between spontaneous aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and a decrease in oligopeptide binding protein. Journal of Bacteriology 1998. 180:5484–5488.
30. Leclerc, D., P. Melancon, y L. Brakier-Gingras. Mutations in the 915 region of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA reduce the binding of streptomycin to the ribosome. Nucleic Acid Research. 1991. 19:3973–3977.
31. Linde, H.-J., Notka, F. Metz M. Kochanowski, B . Heisig, P. y Lehn. N. In vivo increased resistance to Ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000. 44:1865–1868.
32. Mortlock, R.P. Microorganisms as Model Systems for Study-ing Evolution. Plenum Press, New York. 1984.
33. Patterson, C. Evolution. Cornell University Press, Ithaca, NY. 1978.
34. Springer, B., Kidan, Y.G. Prammananan, T. Ellrott, K. Böttger, E. C. y Sander, P. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gen conferring resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2001. 45:2877–2884.
35. Snyder, L., y Champness. W. Molecular Genetics of Bacteria. ASM Press, Washington, DC. 2003.
36. Yigit, H., Anderson, G. J. Biddle, J. W. Steward, C. D. Rasheed, J. K. Valera, L.L. McGowan, J.E. y Tenover. F.C. Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002. 46:3187–3822.
37. Anderson AL. Is Bacterial Resistance to Antibiotics an Appropriate Example of Evolutionary Change?. Creation Research Society Quarterly, 2005. Vol. 41(4)318-326.
38. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillinresistant *Staphylococcus aureus*: Identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. Microb Drug Resist 2001;7:349-361.
39. Velazquez MME, Aires de Sousa M, Echaniz AG, Solorzano SF, Miranda NG, Silva SJ, De Lencastre H. Surveillance of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico city during a 7- year period (1997 to 2003): Clonal evolution and impact of infection control. J Clin Microbiol 2004;42:3877-3880.
40. Kreiswirth BJ, Kornblum RD, Arbeit W, Eisner JN, Maslow A, McGeer DE et alI. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science 1993;259:227-230.
41. De Lencastre H, Couto I, Santos I, Melo CJ, Torres PA, Tomasz A. Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: Characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:64-73.

42. Domínguez MA, De Lencastre H, Liñares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. J Clin Microbiol 1994;32:2081-2087.
43. Sanches I, Ramirez M, Troni H, Abecassis M, Padua M, Tomasz A, De Lencastre H. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone between Portugal and Spain. J Clin Microbiol 1995;33:1243-1246.
44. Mato R, Santos I, Venditti M, Platt DJ, Brown A, Cheng M, De Lencastre H. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. Microb Drug Resist 1998;4:107-112.
45. Witte W, Kresken M, Bräulke C, Cuny C. Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospital. Clin Microbiol Infect 1997;3:414-422.
46. Deplano A, Witte W, Van Leeuwen WJ, Brun y Struelens MJ. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. Clin Microbiol Infect 2000;6:239-245.
47. Melter O, Aires de Sousa M, Urbaskova P, Jakubo V, Zemlickova H, De Lencastre H. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. J Clin Microbiol 2003;41:4998-5005.
48. Roberts RB, De Lencastre A, Eisner W, Severina EP, Shopsis B, Kreiwith BN, Tomasz A et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. J Infect Dis 1998;178:164-171.
49. Teixeira L, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo A, De Lencastre H et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. J Clin Microbiol 1995;33:2400-2404.
50. Aires de Sousa M, Sanches I, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T et al. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. J Clin Microbiol 1998;36:2590-2596.
51. Oliveira D, Sanches IS, Tamayo M, Ribeiro G, Mato R, Costa D et al. Virtually all MRSA infections in the largest Portuguese hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: The "Iberian" and "Brazilian" clones of MRSA. Clin Microbiol Infect 1998;4:373-384.
52. Corso A, Santos SI, Aires De Sousa M, Rossi A, De Lencastre H. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. Microb Drug Resist 1998;4:277-288.
53. Aires De Sousa M, Miragaia M, Santos I, Avila S, Adamson I, Casagrande S et al. Three year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. J Clin Microbiol 2001;39:2197-2205.
54. Melter O, Santos S I, Schindler J, Aires De Sousa M, Mato R, Kovarova V et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. J Clin Microbiol 1999;37:2798-2803.

55. De Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian Hospitals. Clin Microbiol Infect 1997;3:289-296.
 56. Oliveira DC, Crisóstomo I, Santos SI, Major P, Alves CR, Aires De Sousa M, et.al. Comparison of DNA sequencing of the protein A gene polymorphic region with other molecular typing techniques for typing two epidemiologically diverse collections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2001;39:574-580.
 57. Aires De Sousa M, Crisóstomo I, Santos SI, Wu JS, Fuzhong J, Tomasz A, De Lencastre H. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. J Clin Microbiol 2003;41:159-163.
 58. Roberst RB, Chung M, De Lencastre H, Hargrave J, Tomasz A, Nicolau DP, John JF et al. Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey and Pennsylvania. Microb Drug Resist 2000;6:245-251.
 59. Aires De Sousa M, De Lencastre H, Santos SI, Kikuchi K, Totsuka K, Tomasz A. Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. Microb Drug Resist 2000;6:253-258.
 60. Sá-Leão R, Santos SI, Dias D, Peres I, Barros RM, De Lencastre H. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and international samples: Relics of a formerly widely disseminated strains? J Clin Microbiol 1999 37:1913-1920.
 61. Leski T, Oliveira D, Trzcinski K, Sanches I, Aires de Sousa M, Hryniewicz W, De Lencastre H. Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. J Clin Microbiol 1998;36:3532-3539.
 62. Gomes A R, Sanches I, Aires De Sousa M, Castaneda E, De Lencastre H. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: Dominance of a single unique multidrug-resistant clone. Microb Drug Resist 2001;7:23-32.
 63. Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, De Lencastre H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:9865-9870.
 64. De Lencastre H, Chung M, Westh H. Archaic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* molecular and microbiological properties of isolates from the 1960s in Denmark. Microb Drug Resist 2000;6:1-10.
 65. Bustos-Martínez, JA., Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas, M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed 2006; 17:287-305.
 66. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. Salud Publica Mex 2005;47:381-387.
-

Solicitud de Sobretiros:

Biol. Gabriela Sanabria

Investigación y Docencia - IMT

Avda. Venezuela casi Florida

Asunción - Paraguay

investigacion_docencia@imt.edu.py