

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DR DANIEL MÉNDEZ HERNANDEZ.

CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA, IMSS.

Título:

Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y patrón de susceptibilidad a la vancomicina en aislados microbiológicos realizados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza.

Proyecto de tesis para obtener el título de Especialista en Infectología de Adultos.

Dr. Jonathan Rodríguez Pineda.

Residente de la Especialidad de Infectología de Adultos. Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández CMNR, IMSS.

Asesor Clínico: Dr. José Juan Terrazas Estrada*.

Dr. Elena Urdez Hernandez**.

QFB. Eva Aurora Hernández Sánchez***

*Jefe del Servicio de Infectología de Adultos del Hospital de Especialidades CMNR, IMSS.

** Médico Adscrito al servicio de Infectología Adultos del Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández CMNR, IMSS y Profesora Titular del Curso de la Especialidad de Infectología de Adultos Facultad de Medicina UNAM

*** QFB Jefa de sección de Bacteriología Sanitaria del Laboratorio Clínico del Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández CMNR, IMSS.

México DF. Febrero 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. José Juan Terrazas Estrada.

Dra. Elena Urdez Hernández.

QFB. Eva Aurora Hernández Sánchez.

Dra. Verónica Gaona Flores.

Coordinadora de Educación Médica e Investigación en Salud.

Hospital de Infectología Daniel Méndez Hernández. CMN La Raza IMSS.

Dra. Elena Urdez Hernández.

Profesora Titular del Curso de la Especialidad de Infectología de Adultos Facultad de Medicina UNAM

Agradecimientos.-

A Brenda mi esposa que me ha apoyado en todo momento sobre todo en los malos... cuando todo parece oscuro ella me ayuda a ver la luz... siendo el apoyo inigualable y la piedra angular de esta mi adorada familia..... que dejo todo para acompañarme en este sueño que se cumple día a día... y por ser la mejor mama del mundo...

A Jonathancito que se ha convertido en el generador de sueños, que le ha dado ese brillo y alegría a mi vida... por el cual siempre lucharé por siempre.....

A mis padres... Aida y Librado... que a pesar de todo y contra todo siempre me ha apoyado en todas mis ideas por extrañas que parezcan..... y que siempre me dieron el ejemplo de esfuerzo y constancia para hacer realidad los sueños.

A Erick y Vicky los cuales siempre me ha apoyado incondicionalmente....

A mis asesores... Eva, la Dra. Urdez y el Dr. Terrazas.. que me dedicaron su tiempo invaluable... y confiaron en mí, para este proyecto fue muy importante en mi vida....

Al laboratorio de Microbiología del Hospital de Infectología por la colaboración, facilidades y enseñanzas que me dejaron.

Al laboratorio de Especialidades por su apoyo incondicional para este proyecto.

A mis profesores que marcaron mi desarrollo como infectólogo en especial a Maricela, Mayte, Schabib, Mata, Chaparro... gracias...

A Nikko y Proco... por siempre escucharme y aguantarme....

INDICE.-

RESUMEN	5 - 6
INTRODUCCIÓN	7 - 10
JUSTIFICACIÓN	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....		12
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN		13
OBETIVO	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15 - 18
ANALISIS DE DATOS	19
ASPECTOS ETICOS	20
RESULTADOS	21 - 22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	24
RECOMENDACIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26 - 27
ANEXOS	28 - 36

RESUMEN.

Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y patrón de susceptibilidad a la vancomicina en aislados microbiológicos realizados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza.

ANTECEDENTES: El *S. aureus* es un microorganismo con varios factores de virulencia, capaz de desarrollar resistencia a meticilina y a vancomicina, por modificación del sitio blanco: codificación de la PBP2a por el gen *mec A* para la primera y el segundo adquisición de gen *Van A* o disminución en la susceptibilidad por diferentes factores para la segunda. En ambos casos con elevación de la morbimortalidad.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO: Conocer la prevalencia de *S. aureus* meticilino resistente, y el patrón de susceptibilidad a la vancomicina en aislados de bacteriemias.

DISEÑO DEL ESTUDIO: Estudio de prevalencia.

LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO: Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández, IMSS, México DF.

MATERIAL Y MÉTODOS: Aislados de *S. aureus* de bacteriemias colectadas del 1 de marzo al 31 de agosto del 2010. La resistencia a meticilina se determinó mediante una placa de oxacilina a 4 µg/mL y/o identificación de la proteína PBP2a. El perfil de susceptibilidad a vancomicina se realizó con diluciones en placa.

ANÁLISIS DE RESULTADOS: Se utilizó estadística descriptiva.

RESULTADOS: La prevalencia de resistencia a meticilina fue de 73% (42/57) por ambos métodos. Todos los aislados fueron sensibles a vancomicina, con una CMI 90 = 1 µg/mL. Dos casos (4%) con CMI 2 µg/mL.

CONCLUSIONES: La prevalencia de resistencia a meticilina fue alta. Aunque no se observaron casos resistentes ni intermedios a vancomicina, ya existen microorganismos con susceptibilidad reducida a vancomicina.

ABSTRACT.

Prevalence of resistant *Staphylococcus aureus* methicillin and pattern of susceptibility to vancomycin isolated microbiological conducted in the Infectious Diseases Hospital, National Medical Center La Raza.

BACKGROUND: *S. aureus* is a microorganism with several virulence factors, capable of developing resistance to methicillin and vancomycin, by modification of the target: codification of PBP2a encoded by the gene *mec A* for de first and acquisition of the Van A gene or decrease in the susceptibility by different factors for second. In both cases there is and increased in morbidity and mortality.

STUDY OBJECTIVES: Meet the prevalence of methicillin-resistant *S. aureus*, and the susceptibility pattern to vancomycin among bacteremia isolates.

STUDY DESIGN: Prevalence study.

PLACE OF THE STUDY: Infectious Diseases Hospital Dr. Daniel Méndez Hernández, IMSS, Mexico DF.

MATERIAL AND METHODS: *S. aureus* isolates from bacteremia where from to March 1 to August 31 2010. The resistant to methicillin was performed by plates added with oxacillin 4 µg / mL and / or PBP2a protein identification. The vancomycin profile was done by plates with different dilutions.

ANALYSIS OF RESULTS: Descriptive statistics.

RESULTS: The prevalence of methicillin-resistance was 73% (42/57) for both methods. All isolates were sensitive to vancomycin; with a MIC 90 = 1 µg / mL. Only 2 cases (4%) showed a MIC 2 µg / mL..

CONCLUSIONS: The prevalence of methicillin-resistance was high. Although we don't observed intermediate or resistant vancomycin microorganism, we find 2 cases with reduced vancomycin susceptibility.

1. ANTECEDENTES.

1.1 *Staphylococcus aureus*.

El *S. aureus* es un coco grampositivo miembro del género *Staphylococcus*. Tiene un diámetro de 0.5-1.5 μm y puede encontrarse aislado, en parejas, tétradas, racimos o cadenas. Son colonizadores frecuentes de la piel y mucosas, especialmente en la región anterior de las fosas nasales, donde se encuentra en forma persistente en 20% de la población y en 30% de manera intermitente. (1,2) Presenta los siguientes factores de virulencia que involucran: invasión, persistencia, evasión y destrucción de las defensas del hospedero; invasión/penetración del tejido y desarrollo de sepsis mediada por toxinas.

Es capaz de desarrollar resistencia a los antibióticos principalmente a la meticilina, en donde la presión selectiva de los antibióticos usados por cualquier motivo incrementa la probabilidad de selección de gérmenes resistentes, los cuales se asocian a infecciones tanto nosocomiales como de comunidad. (1)

1.1.2 Epidemiología.

En 2006 el Sistema de Vigilancia Europeo de Antibióticos reportó una incidencia de *S. aureus* meticilino resistente de 0.2 por 100 000 pacientes/día en Dinamarca a 26.9 en Portugal. En el 2005 el Surveillance Network-USA reportó frecuencias de *S. aureus* meticilino resistente de 59% en pacientes internados en sala general, 55% internados en Unidad de Cuidados Intensivos, y 48% en pacientes externos.(3)

1.1.3 Resistencia a Antimicrobianos de *S. aureus*.

La resistencia a la meticilina es ocasionada por una alteración en el sitio blanco de los antibióticos β -lactámicos con la adquisición de la proteína fijadora de penicilinas 2a

(PBP2a), la cual esta codificado por el gen *mec A*; dicho gen se encuentra contenido en el SCCmec segmento móvil. Hay 5 subtipos de SCCmec (I-V) de los cuales solo el I, IV y V codifican e la resistencia a la metilina no así a otros antibióticos no-β-lactámicos. (1,4)

1.1.3 Métodos de identificación y detección de resistencia a la metilina.

La detección de la resistencia a la metilina se realiza por medios fenotípicos y genotípicos. Los primeros, se efectúan mediante la difusión del antimicrobiano en agar (disco y prueba E), dilución en placa, la cual es el estándar de oro para la prueba de susceptibilidad, y la detección específica de inmunoagentes con blanco en la PBP2a (aglutinación en látex), los segundos, mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) con blanco en el gen *mec A* (5,6).

La sensibilidad/especificidad reportadas para las diferentes pruebas son:

Prueba de cefoxitina con disco de difusión (99-100), prueba E (99/98), con técnicas de microdilución (98/100).

Las pruebas con oxacilina con disco de difusión (91/59), con microdilución (85/88) y en VITEK 2 (91/73). Por lo anterior las pruebas con cefoxitina pueden ser usadas para predecir la resistencia mediada por *mecA* en *S. aureus*. (4,7,8)

1.1.4 Resistencia a glicopéptidos (Vancomicina).

La resistencia a los glicopéptidos ha emergido en años recientes a la par del incremento del uso de la vancomicina en pacientes con infecciones severas.

La resistencia a la vancomicina de *S. aureus* se define por el Instituto para Estandares de Laboratorio Clínico (CLSI, Clinical Laboratory Standard Institute), como una concentración

mínima inhibitoria (CMI) ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, sensibilidad intermedia con CMI de 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$ y sensibles con una CMI ≤ 2 . Mientras que los aislados de *S. aureus* resistentes se caracterizan por la incorporación del segmento *vanA* del enterococo, los sensibles e intermedios contienen subpoblaciones con CMI variables de 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$, característica llamada heterorresistencia (SAHRV). El desarrollo de esta se debe a una alteración en la expresión de múltiples elementos genéticos regulatorios y que fenotípicamente se caracterizan por incremento en el grosor de la pared, alteración en la pared celular a los perfiles de las proteínas fijadoras del antibiótico y autólisis de la pared reducida. Estos factores que llevan a la disminución de la susceptibilidad son predictores de falla al tratamiento con vancomicina. (9,10,11)

1.1.5 Métodos de susceptibilidad a vancomicina.

Los métodos para determinar la susceptibilidad a vancomicina se puede realizar por difusión en agar, aceptada para *S. aureus* vancomicina resistente, pero no satisfactorio para aislados vancomicina intermedios y sensibles. Otros métodos como la prueba E, y los métodos automatizados, como Vitek y Microscan, no han demostrado detección exacta de la sensibilidad. Finalmente las placas con dilución del antimicrobiano con diferentes concentraciones pueden ser utilizados (4).

1.2 Infecciones del torrente sanguíneo (bacteriemia).

La infección del torrente sanguíneo (bacteriemia) se define como la presencia de bacterias viables en la sangre documentada por un hemocultivo. Puede ser clasificadas como transitoria, intermitente o persistente y está asociada a una alta morbilidad y mortalidad (16-40%). (12,13)

1.3 Bacteriemia por *S. aureus*.

La bacteriemia causada por *S. aureus* es una infección asociada a alta morbi-mortalidad, complicada frecuentemente con endocarditis infecciosa y osteomielitis vertebral, por lo que tiene un impacto negativo tanto en el pronóstico, estancia hospitalaria y costo de la atención. (14)

1.3.1 Epidemiología de bacteriemia por *S. aureus*.

De acuerdo con datos de SENTRY en el periodo de 1997 a 2002, *S. aureus* es la causa más común de bacteriemia nosocomial tanto en Norte América (prevalencia 26%) como en América Latina (prevalencia 21.6%), pero la segunda en Europa. (15)

2. JUSTIFICACIÓN

La bacteriemia por *S. aureus* en pacientes hospitalizados es un padecimiento que aumenta la mortalidad así como la estancia hospitalaria y los costos en la atención. El diagnóstico oportuno así como el tratamiento empírico y los ajustes a los antimicrobianos con los resultados de laboratorio impactan directamente en el pronóstico del paciente.

Además los patrones de resistencia para vancomicina por *S. aureus* meticilino resistente ha presentado en últimos años modificaciones como la disminución de los puntos de corte para considerarlos como sensibles, intermedios o resistentes, e incluso en los últimos artículos publicados hacen énfasis en los patrones de resistencia hetero-vanco-intermedio los cuales tienen una concentración mínima inhibitoria menor a 4 pero con subpoblaciones con CMI mayores prediciendo falla al tratamiento por lo que los métodos diagnósticos para identificar estas cepas no están adecuadamente estandarizados a nivel local, nacional e internacional

Los métodos diagnósticos automatizados como Vitek 2 que contamos en nuestra unidad, ha reportado inconsistencia en el reporte de la meticilino resistencia y más importante aun en la resistencia a la Vancomicina.

Por lo que conocer la prevalencia, de *S. aureus* meticilino resistente y el perfil de resistencia a la vancomicina es muy importante para tomar decisiones para el inicio de antimicrobianos empíricos de acuerdo a los patrones de resistencia locales del Hospital de Especialidades CMNR e incluso dirigidos por servicio lo cual aumente la posibilidad de un tratamiento exitoso y no guiarse en guías y normas que se establecen con patrones de resistencia no solo de otros Hospitales si no de otros países por lo que este estudio tienen gran importancia ya que se obtendrán datos valiosos que apoyaran al clínico en la toma de decisiones para el tratamiento más adecuado y oportuno de los pacientes.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia que ha desarrollado *S. aureus* a los antibióticos es un problema grave reportado internacionalmente. Sin embargo en el hospital de Infectología Daniel Méndez Hernández se desconocen tanto la prevalencia de resistencia a la meticilina como el patrón de susceptibilidad a vancomicina por lo que en este estudio esperamos conocer la prevalencia de aislados resistentes a meticilina (EARM) y la frecuencia de aislados sensibles, intermedios y resistentes a la vancomicina.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Pregunta de Investigación.

¿Cuál es la prevalencia de *S. aureus* meticilino resistente y el patrón de susceptibilidad a la vancomicina en aislados microbiológicos de bacteriemias en el Hospital de Infectología?

5. OBJETIVOS

Objetivo 1.

- Determinar la prevalencia *S. aureus* metilino resistente en aislados microbiológicos de bacteriemias en el Hospital de Infectología.

Objetivo 2.

- Determinar el perfil de susceptibilidad a la vancomicina de *S. aureus* aislados microbiológicos de bacteriemias en el Hospital de Infectología.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 DISEÑO.

TIPO DE ESTUDIO

Se realizará un estudio de prevalencia (observacional, descriptivo, transversal, prospectivo).

UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

Aislados de *S aureus* de hemocultivos colectados del 1 de marzo del 2010 al 31 de agosto del 2010 procedentes del H. de Infectología del CMNLA.

Las pruebas microbiológicas se efectuarán en el laboratorio de microbiología del Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández CMNR, IMSS en febrero del 2011 hasta concluir los estudios.

6.2 UNIVERSO DE TRABAJO.

6.2.1 SUJETOS DE ESTUDIO

Aislados de *S. aureus* obtenidas de pacientes con Bacteriemia.

6.2.2 OBJETIVO 1: Prevalencia de bacteriemias por *S. aureus* meticilino resistente.

Criterios de inclusión.

1. Evidencia microbiológica de infección por *S. aureus* en ≥ 1 hemocultivo.

Criterios de no inclusión.

1. No aplica.

Criterios de eliminación.

1. No viabilidad del aislado.

OBJETIVO 2: Establecer el perfil de susceptibilidad a la vancomicina de *S. aureus*.

Criterios de inclusión:

1. Evidencia microbiológica de infección por cepas de *S. aureus* en ≥ 1 hemocultivo.

Criterios de no inclusión.

1. No aplica.

Criterios de eliminación.

1. No viabilidad del aislado.

6.2.3 DEFINICIÓN DE VARIABLES.

S. aureus.

Definición conceptual: Cocos grampositivos, agrupados en racimos, catalasa y coagulasa positivos.

Meticilino Resistencia.

Definición Conceptual: Resistencia a la metilina dada por la presencia de la PBP2a codificada por el *mec A*.

Definición Operacional.

Crecimiento de > de 1 colonia de *S. aureus* en placa de Hinton-Mueller con oxacilina a una concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$.

Y/O

Prueba de aglutinación para detección de PBP2a: positiva.

Susceptibilidad a vancomicina.

Definición conceptual: Efecto en el desarrollo de *S. aureus* que resulta de la exposición del microorganismo a varias concentraciones de vancomicina.

Definición operacional: Crecimiento de > de 1 colonia de *S. aureus* en placa de agar con Infusión Cerebro Corazón adicionada con vancomicina a las concentraciones de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$.

VARIABLES.

Para el objetivo 1: Prevalencia de Bacteriemias por *S. aureus* meticilino resistente.

VARIABLE	TIPO	DEFINICION	MEDICION	ESCALA
Variable: Meticilino resistencia	Cualitativa dicotómica	Crecimiento de más de 1 colonia de <i>S. aureus</i> en placa con 4 µg/mL de oxacilina. Detección de PBP2a por aglutinación en látex.	Positiva. Oxacilina: ≥4 µg/mL y/o Detección de PBP2a.	Nominal

Frecuencia de cepas sensibles, intermedias y resistentes a vancomicina.

VARIABLE	TIPO	DEFINICION	MEDICION	ESCALA
Variable: Susceptibilidad a la vancomicina.	Catagórica.	Sensible: Crecimiento de > de 1 colonia de <i>S. aureus</i> en placa con Vancomicina a concentraciones de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml. Intermedia: Crecimiento de > de 1 colonia de <i>S. aureus</i> en placa con Vancomicina a concentraciones de 4 µg/ml, 8 µg/ml. Resistentes: Crecimiento de > de 1 colonia de <i>S. aureus</i> en placa con Vancomicina a concentración de ≥16 µg/ml.	Crecimiento visible de > de 1 colonia en placa de agar.	Nominal

6.3 METODOS MICROBIOLÓGICOS.

6.3.1 ESTRATEGIA DE TRABAJO. (ANEXO 1).

6.3.2 TÉCNICA Y PROCEDIMIENTO

6.3.2.1 Recolección de aislados de *S. aureus* almacenadas en congelación a menos 20°C en caldo soya tripticaseína con glicerol al 5% (ANEXO 2).

6.3.2.2 Activación de cepas.

6.3.2.3 Identificación de cocos grampositivos por tinción gram (ANEXO 3).

6.3.2.4 Cultivo de muestras en medios convencionales (Agar sangre / Agar Chocolate / SAID) para determinar morfología colonial. (ANEXO 4)

6.3.2.5 Identificación de la cepa bacteriana (prueba de catalasa y coagulasa) (ANEXO 5).

6.3.2.6 Confirmación de identificación de *S. aureus* por método de microdilución en sistema automatizado VITEK 2 con tarjeta GP (ANEXO 6).

6.3.2.7 Determinación de cepas meticilino resistentes (16).

6.3.2.7.1 Detección de PBP2a por prueba de aglutinación en látex por Slidex MRSA (ANEXO 7).

6.3.2.7.2 Crecimiento de *S aureus* en placa de agar Hinton-Mueller con oxacilina a una concentración de 4 µg/mL (Anexo 8).

6.3.2.8 Determinación de concentración mínima inhibitoria para la vancomicina de las cepas de *S. aureus*. (ANEXO 9) (16).

6.3.2.8.1.1.1 Crecimiento de *S. aureus* en placa de agar Infusión-Cerebro-Corazón a las concentraciones de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4µg/ml, 8µg/ml y 16µg/ml.

7 ANÁLISIS DE DATOS

Para el objetivo 1 se calculará la prevalencia de bacteriemias por *S. aureus* meticilino resistente.

Número de casos con la enfermedad en un momento dado.

P = _____

Total de población en ese momento.

Para el objetivo 2 se describirá la frecuencia de los aislados de *S. aureus* sensibles, intermedias y resistentes a la vancomicina.

8. ASPECTOS ÉTICOS

Regulaciones Locales / Declaración de Helsinki

El estudio se realizó en pleno cumplimiento de los principios de la “Declaración de Helsinki”(con sus respectivas reformas en Tokio, Venecia, Hong Kong y Sudáfrica). El estudio cumplió estrictamente los principios establecidos en los “Lineamientos para las Buenas Prácticas Clínicas”, Lineamientos Tripartitas ICH (Enero 1997).

El estudio no requiere ninguna entrevista, toma de muestra o acción directa con el paciente.

Los datos requeridos para la identificación de la muestra se mantienen en completo anonimato y solo están disponibles para el investigador y los asesores del estudio.

9. RESULTADOS.

9.1 Prevalencia de resistencia a la meticilina.

9.1.2 Detección de PBP2a

De los 57 aislados en 42 (73%) se evidencio la PBP2a por medio de aglutinación en látex y en los 15 (27%) restantes no se detecto.

9.1.3 Prueba de difusión en agar con oxacilina 4 µg/mL.

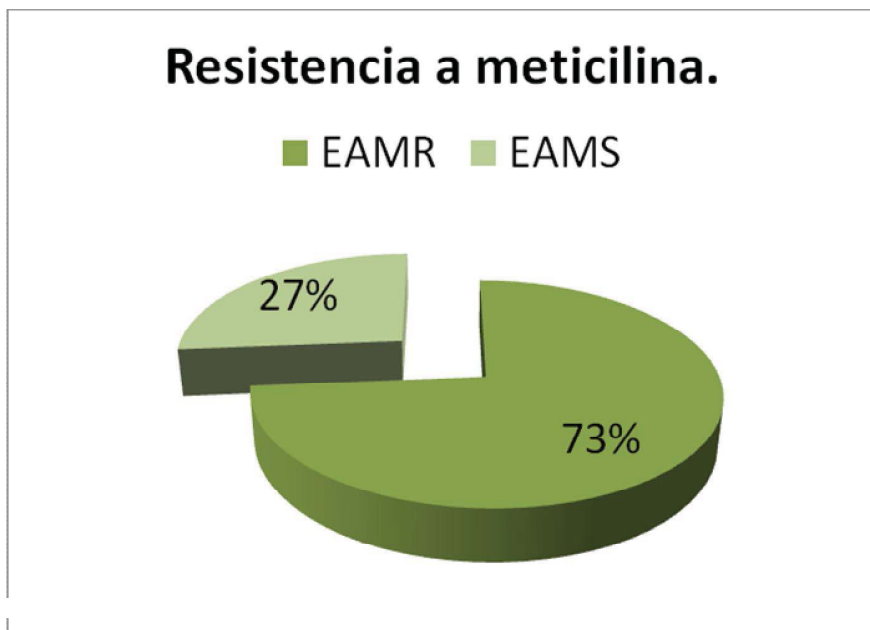
Por este método 42 (73%) aislados presentaron crecimiento de más de una colonia observable catalogándose como resistente a la meticilina y 15 (27%) aislados no presentaron crecimiento.

Por lo que la prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina en los aislados del Hospital de Infectología fue de 73%.

42 aislados de *S. aureus* resistente a meticilina.

P = _____ = 0.73

57 aislados en total de *S. aureus*.



Por lo que la prevalencia de *S aureus* resistente a la meticilina en los aislados del Hospital de Infectología fue de 73%.

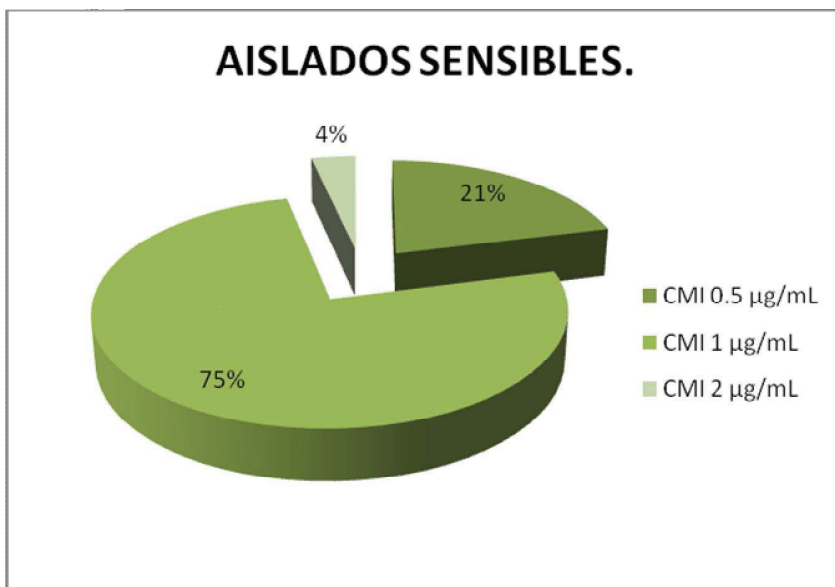
En el estudio se observó una correlación del 100% entre los dos métodos para la detección de la resistencia a la meticilina.

9.2 Perfil de susceptibilidad a la vancomicina.

9.2.1 Aislados sensibles.

Los 57 aislados de *S. aureus* fueron sensibles a la vancomicina, con la siguiente CMI:

- 12 (21%) = 0.5 µg/mL.
- 43 (75%) = 1 µg/mL.
- 2 (4%) = 2 µg/mL.



El rango de CMI del total de aislados = 0.5 a 2 µg/mL.

La CIM 50 = 1 µg/mL.

La CIM 90 = 1 µg/mL.

9.2.2 Aislados con susceptibilidad intermedia.

No se encontraron.

9.2.3 Aislados con susceptibilidad resistente.

No se encontraron.

10. DISCUSIÓN.

La resistencia a la meticilina es una característica de *S. aureus* identificada en el microorganismo desde 1961, sólo 2 años después de iniciado el uso de meticilina (17). La prevalencia de tal característica, en diferentes muestras microbiológicas, varía internacionalmente. Dicha variabilidad depende tanto del área geográfica, por clonas predominantes, como de los factores de riesgo de hospedero. Así, mientras que Suecia tiene una prevalencia del 0.5%, Portugal y Malta alcanzan el 48.4% y 52.4%, respectivamente. Con respecto a los factores de riesgo son bien reconocidos los siguientes: infección o colonización previa por SAMR; úlceras o celulitis al momento de la admisión hospitalaria; presencia de catéteres intravasculares o urinarios; infecciones de postquirúrgicas; usuarios de drogas intravenosas; pacientes inmunosuprimidos; y la atención intrahospitalaria, como lo evidenció el Surveillance Network-USA en el 2005 cuyo reporte muestra un 59% de resistencia a la meticilina entre los pacientes en sala general, 55% en unidad de cuidados intensivos (3,15).

En nuestro estudio la prevalencia de resistencia a meticilina entre los aislados de *S. aureus* fue del 73% (42 de 57). Dicha proporción resulta elevada si se compara con estudios previos donde se reportan prevalencias oscilantes de 5% a 51.7% en hemocultivos (18, 19, 20). El encontrar que casi 1 de 4 *S. aureus* es resistente a meticilina es un hecho esperado si tomamos en cuenta el incremento gradual de tal fenotipo observado durante los últimos años en México con otros países.

En nuestro estudio no encontramos ningún *S. aureus* resistente ni intermedio a vancomicina. Esto concuerda con los reportes nacionales (20). Sin embargo a nivel mundial se han reportado ambos fenotipos. Los aislados resistentes se han documentado a partir del 2002, 9 hasta hoy, la mayoría en Estados Unidos (21, 22). Los microorganismos de susceptibilidad intermedia tienen las siguientes características: han emergido gradualmente en varios países, a partir del primer caso identificado en Japón, en 1997; la prevalencia oscila de 0 a 8.4%, dato debe tomarse con reserva, por la variabilidad de los métodos utilizados; la detección de microorganismos intermedios es trascendente clínicamente, puesto que se asocian a fallas al tratamiento con vancomicina. Sin embargo la identificación precisa de tal fenotipo no se realiza por los sistemas automatizados utilizados comúnmente en la práctica médica.

Aunque no se identificaron aislados con susceptibilidad intermedia o resistente, si se observaron dos casos (4%) cuya CMI fue de 2 µg/mL, esto es relevante pues se sabe que hasta el 50% de estos microorganismos expresarán resistencia heterogénea. Esto es, existen subpoblaciones con susceptibilidad reducida a la vancomicina (22).

Por lo tanto, se hace necesaria la implementación de un método estandarizado para la vigilancia epidemiológica.

11. CONCLUSIONES.

1. La prevalencia de *S. aureus* con resistencia a la meticilina en aislados es del 73%, mayor a lo reportado en nuestro país y entre las más altas a nivel mundial.
2. Aunque el perfil de susceptibilidad a la vancomicina nos muestra que todos los aislados son sensibles (CMI 0.5 a 2), la CMI 90 fue de 1 µg/mL; sin embargo se identificaron 2 microorganismos con CMI 2 µg/mL, entre los cuales pudiera existir resistencia heterogénea y representar un problema en el tratamiento.

La susceptibilidad a la vancomicina determinado por el sistema automatizado VITEK 2 no correlaciono con el método de dilución en placa de agar BHI a diferentes concentraciones de vancomicina (estándar) por lo que este método es el ideal para continuar la vigilancia de la susceptibilidad a la vancomicina.

12. RECOMENDACIONES.

1. Reforzar el sistema de vigilancia epidemiológica para los patógenos más frecuentes.
 - Mantener los métodos estándares para la vigilancia epidemiológica.
 - Establecer métodos para la determinación de la clonalidad en el estudio de brotes, como PCR o campos pulsados, e implementar estrategias de control pertinentes.
2. Divulgación de los patrones de susceptibilidad de los patógenos de mayor importancia clínica, por parte del Laboratorio de Bacteriología y del Comité de Antibióticos.
3. Propiciar el uso racional de antimicrobianos, tanto en este centro como las unidades de referencia, de acuerdo a los patrones de susceptibilidad observados en los aislamientos y analizados por el Comité de Antimicrobianos del Hospital.
4. Implementar medidas de control en áreas críticas para evitar la diseminación de aislados resistentes:
 - a. Búsqueda dirigida de los pacientes colonizados con factores de riesgo para infección por EAMR (pacientes con catéteres intravasculares).
 - b. Aislamiento de contacto de pacientes colonizados o infectados por EAMR.
 - c. Reforzar el lavado de manos tanto en el personal médico como en el no médico.
 - d. Restricción razonada de antimicrobianos.

13. Bibliografía.

1. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. CID 2008;46: S350-S358.
2. Dolin R, Bennett J, Mandell GL. Enfermedades infecciosas principios y práctica. 6a.edición. Madrid: Elsevier. 2006: 2321-2351.
3. Cauda R, Garau J. New insights concerning methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. Clinical Microbiology and Infection 2009; 15: 109-111.
4. Appelbaum PC. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. CID 2007; 45: S165-70.
5. Koskinen JO, Stenholm T, Vaarno J, Soukka J, Meltola NJ, Soini AE. Development of rapid assay methodology for antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 62: 306-316.
6. Gupta H, McKinnon N, Louie L, Simor AE. Comparison of six rapid agglutination test for the identification of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant strains. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 31: 333-336.
7. Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Jevitt L, Zhu W et al. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 58: 33-39.
8. Matthew AW. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. 2006; 26:3; 44-51.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement. CLSI document M100-S18 Wayne, PA: CLSI, 2008.
10. Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in United States, 2002-2006. CID 2008; 46: 668-74.
11. Pillai SK, Wennert C, Venkataraman L, Eliopoulos GM, Moellering RC, Karchmer AW. Development of reduced vancomycin susceptibility in methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*. CID 2009; 49: 1169-74.
12. Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. CID 2009; 48: S238-45.
13. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. CID 2004; 39: 309-17
14. Corey GR. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: definitions and treatment. CID 2009; 48: S254-9.

15. Naber CK. *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. CID 2009; 48: S231-7.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 20th informational supplement. CLSI document M100-S20 2010; 30 (1): 60-72.
17. Sifuentes OJ, Pérez PS. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: la sombra de una amenaza permanente. Rev Invest Clin 2006;58 (6): 598- 607.
18. Alpuche AC, Avila FC, Espinoza ML. Antimicrobial sensitivity profile of *Staphylococcus aureus* at a pediatric hospital: prevalence of resistance to methicillin. Bol Med Infant Mex 1989; 46: 700-704.
19. Alvarez JA, Ramírez AJ, Mojica LM, Huerta JR, Dayane GD, Rolón AL, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en un hospital general: panorama epidemiológico del 2000 al 2007. Rev Invest Clin 2009; 61 (2): 98-103.
20. Ponce LA, Camacho OA, Macias AE, Landín LC, Villanueva WC, Trinidad GD et al. Epidemiology and clinical characteristic of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in a tertiary-care in Mexico City: 2003-2007. Rev Invest Clin 2010; 62 (6): 553-559.
21. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin ---United States, 2002. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 51: 564-567.
22. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduce Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol. Rev 2010; 23 (1): 99 - 139.

ANEXO 1.

FLUJOGRAMA DE TRABAJO EN LABORATORIO

Reactivación de *S. aureus* de hemocultivos

Purificación de cepas

Realización de pruebas bioquímicas y pruebas de sensibilidad por método automatizado (VITEK II / Tarjeta GP)

EVALUACION DE RESISTENCIA A METICILINA

SLIDEX MRSA	DILUCION EN PLACA
DETECCION DE PBP2a	OXACILINA 4 µg/ml

Emplear cepas ATCC

S. aureus SENSIBLE A METICILINA: *S. aureus* ATCC 29213

S. aureus RESISTENTE A METICILINA: *S. aureus* ATCC 43300

EVALUACION DE VANCOMICINA

DILUCION EN PLACA
VANCOMICINA
0.5 µg/ml
1 µg/ml
2 µg/ml
4 µg/ml
8 µg/ml
16 µg/ml

Emplear cepas ATCC

Enterococcus faecalis ATCC 29212, sensible a vancomicina.

Enterococcus faecalis ATCC 51299 resistente a vancomicina.

ANEXO 2 ALMACENAMIENTO DE CEPAS.

De un cultivo puro de 24 horas, se realiza un subcultivo en caldo soya tripticaseina con glicerol al 15%, dejando incubar de 18 a 24 horas a 37°C para congelación posterior a menos 20°C.

Nota el glicerol de utiliza como crioprotector celular.

ANEXO 3. TINCION GRAM.

Fundamento: Se basa en las diferencias entra la pared celular de los gram positivos y los gram negativos, los gram positivos poseen una gruesa capa de petidoglican que logra retener el complejo cristalvioleta/yodo, en cambio la membrana de las gram negativas es solubre al alcohol/acetona y posee una capa muy delgada de peptidoglicano.

1. Realizar frote y fija con color.
2. Colocar cristal violeta y dejar 1 minuto.
3. Enjuagar con agua y escurrir.
4. Colocar lugo y dejar 1 minuto.
5. Enguajar con agua y escurrir.
6. Decolorar con alcohol/acetona de 30 segundos a 1 minuto.
7. Enguajar escurrir.
8. Colocar safranina por 1 minuto.
9. Enguajar escurrir.
10. Secar.
11. Observar al microcopio.

ANEXO 4. SUBCULTIVO DE LOS AISLADOS.

Sembrar en medios de gelosa sangre, gelosa chocolate por estria cruzada.

Incubar 24 horas, a 35° C.

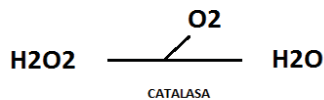
Observar morfología colonial.

- Morfologías observadas en el estudio: Colonias de border definidos, circulares, convexas, de 1 a 4 mm de diámetro que van desde colonias blancas a amarillas, hemolíticas.

ANEXO 5. CATALASA Y COAGULASA.

CATALASA.

Fundamento: Determinar la presencia de la enzima de la catalasa mediante el uso de peróxido de hidrógeno al 3%.



1. Colocar en un portaobjeto una gota de peróxido de hidrógeno al 3%.
2. Tomar con un aplicador esteril una colonia pura evitando tomar parte del medio.
3. Mezclar con la gota de peróxido y observar burbujeo para determinar prueba positiva por la liberación del oxígeno.

COAGULASA.

Fundamento: Evidenciar la prescencia de la enzima coagulasa.

Si la bacteria posee la enzima coagulasa en presencia de plasma activará la cascada de coagulación formando un coágulo.

1. Colocar 0.5 ml de plasma en tubo esteril.
2. Tomar una colonia pura y disolverla en el plasma con un aplicador esteril.
3. Meter a incubar a 37° C. y observar a las 2 horas la formación de coágulo para determinar prueba positiva.

ANEXO 6 IDENTIFICACIÓN POR SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK 2.

1. Calibración de nefelómetro a 3.00 +/- 0.3
2. Realizar suspensión bacteriana de cepa pura de *S. aureus* (incubación de 24 hrs) con nefelómetro a una concentración de (0.56 – 0.63).
3. Alimentar tarjeta GP con suspensión bacteriana.
4. Introducir datos en consola de VITEK 2 (identificación de la cepa, fecha de muestreo).
5. Procesamiento de 18 a 24 horas.
6. Lectura de los resultados de identificación.
 - Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del inserto del sistema automatizado VITEK 2 proporcionado por el fabricante.

ANEXO 7 IDENTIFICACIÓN DE PBP2a POR SLIDEX MRSA.

Fundamento: Aglutinación de partículas de latex que permite la detección de la resistencia a meticilina en cepas de *S aureus* mediante la detección del PBP2 proteína codificada por el gen Mec A.

Las partículas de látex están sensibilizadas con un anticuerpo monoclonar contra la PBP2.

Reactivo: Slidex MRSA detection. Marca Biomerieux.

Técnica de acuerdo al inserto del fabricante.

ANEXO 8 IDENTIFICACIÓN DE LA METICILINORRESISTENCIA.

PRUEBA: Dilución en placa de agar Hinton – Mueller + 2% de cloruro de Na + 4 µg/mL de Oxacilina.

Fundamento: Método fenotípico para determinación del efecto de la oxacilina en las cepas de *S aureus* in vitro.

Preparación del antibiotico.

Nota: En el estudio se utilizó Oxacilina sodica monohidratada marca Sigma Aldrich; potencia 874 µg/mg.

1. Preparación de la solución base.
 - a. Considerando la potencia del antibiotico se peso 2.252 mg de Oxacilina y se aforaron a 50 mL para obtener una concentración de 40 µg/mL.

(Se preparo el antibiotico a una concentración 10 veces mayor debido a que se diluye en el volúmen final de medio, quedando una concentración final de 4 µg/mL).

Preparación de la placa de agar Hinton-Mueller + 2 % NaCl + oxacilina 4 µg/mL.

- a) Pesar 19 gr de base de Hinton-Mueller + 2 gr de NaCl.
- b) Hidratar con 450 mL de agua bidestilada.
- c) Esterilizar en autoclave de vapor a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
- d) Atemperar el medio de 40 a 45°C.
- e) Añadir los 50 mL de solución de Oxacilina previamente preparados y mezclar perfectamente.
- f) Vaciar 15 mL del medio en cada placa Petri esteril.
- g) Dejar enfriar.
- h) Realizar pruebas de esterilidad.
- i) Almacenar en refrigeración a una temperatura de 4 a 8°C.

Inoculación de las placas de agar Hinton-Mueller + 2% de NaCl + 4 µg/mL de Oxacilina.

- a) De cultivos puros de 24 horas de *S. aureus* realizar una suspensión bacteriana al 0.5 de MacFarland, posteriormente se hace una disolución de 1:10 en solución salina esteril y se toma un inóculo final de 1×10^4 UFC/mL.
- b) Se utilizan cepas control ATCC *S. aureus* 29213 para metilino resistente y ATCC *S. aureus* 43300 para metilino sensible.
- c) Tomar un inóculo de 10 µL y depositar en placas de oxacilina previamente colocadas a temperatura ambiente y rotuladas.
- d) Incubar 24 horas a 35°C.
- e) Observar crecimiento bacteriano.

Determinar si la cepa es Sensible o Resistente.

ANEXO 9 DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A VANCOMICINA.

Prueba de dilución en placa de agar BHI con 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 µg/mL de Vancomicina.

Fundamento: Método fenotípico para determinación del efecto de la vancomicina en las cepas de *S aureus* in vitro.

Nota: En el estudio se utilizó hidroclorehidrato de vancomicina marca Sigma Aldrich; potencia 900 µg/mg.

Preparación de la soluciones base.

- a. Considerando la potencia del antibiotico se pesaron 8.888 mg de vancomicina y se aforaron a 50 mL para obtener una concentración de 160 µg/mL.
- b. Considerando la potencia del antibiótico se pesaron 8.888 mg de vancomicina y se aforaron a 100 mL para obtener una concentración 80 µg/mL.

Preparación del agar BHI + 16 µg/mL de vancomicina.

- a. Pesar 25 g de base de agar BHI.
- b. Hidratar con 450 mL de agua bidestilada.

- c. Esterilizar en autoclave de vapor a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
- d. Atemperar el medio de 40 a 45°C.
- e. Añadir los 50 mL de solución de vancomicina previamente preparada (solución base de vancomicina con 160 µg/mL) y mezclar perfectamente.
- f. Vaciar 15 mL del medio en cada placa Petri esteril.
- g. Dejar enfriar.
- h. Realizar pruebas de esterilidad.
- i. Almacenar en refrigeración a una temperatura de 4 a 8°C.

Preparación del agar BHI + 8 µg/mL de vancomicina.

- a. Pesar 25 g de base de agar BHI.
- b. Hidratar con 450 mL de agua bidestilada.
- c. Esterilizar en autoclave de vapor a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
- d. Atemperar el medio de 40 a 45°C.
- e. Añadir los 50 mL de solución de vancomicina previamente preparada (solución stock de vancomicina con 80 µg/mL) y mezclar perfectamente.
- f. Vaciar 15 mL del medio en cada placa Petri esteril.
- g. Dejar enfriar.
- h. Realizar pruebas de esterilidad.
- i. Almacenar en refrigeración a una temperatura de 4 a 8° centígrados.

Preparación del agar BHI + 4 µg/mL de vancomicina.

- a. Pesar 25 g de base de agar BHI.
- b. Hidratar con 475 mL de agua bidestilada.
- c. Esterilizar en autoclave de vapor a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
- d. Atemperar el medio de 40 a 45°C.
- e. Añadir los 25 mL de solución de vancomicina previamente preparada (solución base de vancomicina con 80 µg/mL) y mezclar perfectamente.

- f. Vaciar 15 mL del medio en cada placa Petri esteril.
- g. Dejar enfriar.
- h. Realizar pruebas de esterilidad.
- i. Almacenar en refrigeración a una temperatura de 4 a 8°C.

Preparación del agar BHI + 2 µg/mL de vancomicina.

- a. Pesar 25 g de base de agar BHI.
- b. Hidratar con 487.5 mL de agua bidestilada.
- c. Esterilizar en autoclave de vapor a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
- d. Atemperar el medio de 40 a 45°C.
- e. Añadir los 12.5 mL de solución de vancomicina previamente preparada (solución base de vancomicina con 80 µg/mL) y mezclar perfectamente.
- f. Vaciar 15 mL del medio en cada placa Petri esteril.
- g. Dejar enfriar.
- h. Realizar pruebas de esterilidad.
- i. Almacenar en refrigeración a una temperatura de 4 a 8°C.

Preparación del agar BHI + 1 µg/mL de vancomicina.

- a. Pesar 25 g de base de agar BHI.
- b. Hidratar con 493.75 mL de agua bidestilada.
- c. Esterilizar en autoclave de vapor a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
- d. Atemperar el medio de 40 a 45°C.
- e. Añadir los 6.25 mL de solución de vancomicina previamente preparada (solución base de vancomicina con 80 µg/mL) y mezclar perfectamente.
- f. Vaciar 15 mL del medio en cada placa Petri esteril.
- g. Dejar enfriar.
- h. Realizar pruebas de esterilidad.
- i. Almacenar en refrigeración a una temperatura de 4 a 8°C.

Preparación del agar BHI + 0.5 µg/mL de vancomicina.

- a. Pesar 25 g de base de agar BHI.
- b. Hidratar con 496.87 mL de agua bidestilada.
- c. Esterilizar en autoclave de vapor a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
- d. Atemperar el medio de 40 a 45°C.
- e. Añadir los 3.13 mL de solución de vancomicina previamente preparada (solución base de vancomicina con 80 µg/mL) y mezclar perfectamente.
- f. Vaciar 15 mL del medio en cada placa Petri esteril.
- g. Dejar enfriar.
- h. Realizar pruebas de esterilidad.
- i. Almacenar en refrigeración a una temperatura de 4 a 8°C.

Inoculación de la placa de agar BHI + 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 µg/mL de vancomicina.

- a. De cultivos puros de 24 horas de *S. aureus* realizar una suspensión bacteriana al 0.5 de MacFarland, posteriormente se hace una disolución de 1:10 en solución salina esteril y se toma un inóculo final de 1×10^4 UFC/mL.
- b. Se utilizarán cepas *E. faecalis* ATCC 29212, sensible a vancomicina y *E. faecalis* ATCC 51299 resistencia a vancomicina, como control del procedimiento.
- c. Tomar un inóculo de 10 µL y depositar en placa de vancomicina en cada una de las concentraciones previamente mencionadas ya atemperadas y rotulada.
- d. Incubar 24 horas a 35°C.
- e. Observar crecimiento bacteriano en cada una de las placas de las diversas concentraciones.

Determinar si es sensible, intermedio o resistente y la CMI de cada aislado.